



**UnB**

**AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE CLONES E  
CULTIVARES DE BATATA À MURCHA BACTERIANA  
(*Ralstonia solanacearum*)**

**ARTUR FERREIRA LIMA NETO**

Tese apresentada à Universidade de  
Brasília, para obtenção do título de Doutor  
em Fitopatologia, Área de Concentração:  
Doenças parasitárias de plantas.

**BRASÍLIA**  
**Distrito Federal - Brasil**  
**2005**

**AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE CLONES E  
CULTIVARES DE BATATA À MURCHA BACTERIANA  
(*Ralstonia solanacearum*)**

**ARTUR FERREIRA LIMA NETO**

Orientador: Prof. Dr. **CARLOS ALBERTO LOPES**

**Tese apresentada à Universidade de  
Brasília, para obtenção do título de Doutor  
em Fitopatologia, Área de Concentração:  
Doenças parasitárias de plantas.**

**BRASÍLIA  
Distrito Federal - Brasil  
2005**

**ARTUR FERREIRA LIMA NETO**

Engenheiro Agrônomo

**TESE** submetida como parte dos requisitos para obtenção do Grau de **DOUTOR EM FITOPATOLOGIA** do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade de Brasília.

**Brasília – DF, Brasil.**

Aprovada em: 19.12.2005

Banca Examinadora:

CARLOS ALBERTO LOPES  
(Orientador) Embrapa Hortaliças

ADALBERTO C. CAFÉ FILHO  
PPG Fitopatologia - UnB

LEONARDO SILVA BOITEUX  
Embrapa Hortaliças

LUIZ EDUARDO BASSAY BLUM  
PPG Fitopatologia – UnB

OLINDA MARIA MARTINS  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

"Adquire sabedoria, adquiere inteligência, e não te esqueças nem te apartes das palavras da minha boca.

Não a abandones e ela te guardará; ama-a, e ela te protegerá.

A sabedoria é a coisa principal; adquiere pois a sabedoria, emprega tudo o que possuis na aquisição do entendimento.

Exalta-a, e ela te exaltará; e, abraçando-a tu, ela te honrará...

...No caminho da sabedoria te ensinei, e por veredas de retidão te fiz andar.

Por elas andando, não te embaraçarão os teus passos; e se correres não tropeçarás".

#### **Provérbios 4: 5-12**

Aqui não falta sol

Aqui não falta chuva

A terra faz brotar qualquer semente

Se a mão de Deus

Protege e molha nosso chão

Por que será que tá faltando pão?

Se a natureza nunca reclamou da gente

Do corte do machado,

a foice, o fogo ardente

Se nessa terra tudo que se planta dá

Que é que há, meu país?

O que é que há?

(Zezé Di Camargo)

### **ORAÇÃO DA FAMÍLIA**

"...Que a família comece e termine sabendo onde vai.  
E que o homem carregue nos braços a graça de um pai.  
Que a mulher seja um céu de ternura, aconchego e calor.  
E que os filhos conheçam a força de onde brota o amor..."

Pe. Zezinho, SCJ

**Aos meus pais, Raimunda Lemos e Sipriano Gomes, faço de minha conquista o instrumento de gratidão, respeito, amor, carinho, compreensão e reconhecimento que recebi.**

**Aos meus irmãos, Tânia, Paulo e Fábio... pela alegria**

**A minha esposa, Jorciane... pela paciência e amor**

**Aos meus sobrinhos...pelo futuro**

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Ao querido Estado do Tocantins, e a todos àqueles que sonham com um mundo mais justo e humano.

À Universidade de Brasília, em especial ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade concedida para a realização do curso de Doutorado.

À Embrapa Hortaliças e toda sua equipe técnica, pela oportunidade concedida para a implantação dos ensaios experimentais em campo e laboratório.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Dr. Carlos Alberto Lopes, pela amizade, apoio e orientação, fatores fundamentais para a realização deste trabalho. Dedicção e austeridade, não só palavras, atitudes que lhe acompanham em todos os momentos.

Ao inesquecível Dr. Leonardo Silva Boiteux, pelo companheirismo, incentivo e ensinamentos. Em você, percebi que mais que dedicação, pesquisa é realmente uma “ARTE”.

A Dr. Olinda Maria Martins, da Embrapa Cenargen, pela amizade e auxílios durante a execução dos trabalhos de tese, meu reconhecimento e gratidão.

Aos colegas de Fitopatologia da Universidade de Brasília, Samara, Marlos, Eiko, Eliana, Gesimária, Gil, Alexei, Denise, Carlos Augusto, Harley, Valdir, Luiz Cláudio, Marcos Freitas, Lenisa, Brener, German, Dílson, Dinaélia, Loiselene e Giovana, pelo convívio e amizade.

Aos amigos da Vila Planalto, Peixoto, Tião, Nadim, Ivo, Aílton, Antônio, Cláudio e a turma do Restaurante do Beija, pelos momentos que juntos passamos. Para mim, mais que descontração, encontrei carinho nos momentos de solidão, algo que somente acreditara ser possível junto aos familiares. Meu muito obrigado em nome do Peixoto, amigo de todas as horas.

Ao amigo Gutemberg Barone de Araújo Nojosa, o “Ministro”. Companheiro de República e dos bons momentos vividos na cidade de Brasília. Agradeço pelos auxílios, críticas e sugestões.

Ao grande amigo e companheiro Leonardo Minaré Braúna. “Amigo é coisa pra se guardar...” Mais que um amigo, um irmão.

Ao Dr. Ossami Furumoto, pelos auxílios prestados durante a execução dos experimentos de campo e pela indescritível paciência em todas as etapas necessárias à condução dos trabalhos de campo.

A *Hayashi Batatas* pelo apoio estrutural concedido para a realização dos ensaios de campo na cidade de Cristalina – GO.

A Bárbara, pela amizade e companheirismo.

Aos companheiros da Embrapa Hortaliças, William, Aílton, Marcos Câmara, Gilmar Henz, Nuno, Giordano, Maria Esther, Valter, Mendonça, Arnaud, José Maria, Nivaldo, Pedro, Francisca, Patrícia, Ana, Jaqueson, Antônio Olímpio, Joaquim Olímpio, Dona Eremita, Ronaldo, Valmir, Edvaldo e a turma da batata.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília, em especial ao Prof. Dr. Adalberto C. Café Filho, pelos auxílios e sugestões apresentadas durante a execução dos trabalhos da tese, e por ter conduzido com sabedoria e humildade a Coordenação do Programa de Pós-graduação.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia da UnB, Ribamar, Cleber, Dona Francisca, Arenildo, Marivaldo e César, obrigado.

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

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xii
RESUMO .....	xiv
ABSTRACT .....	xv

### CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. A batata.....	1
1.2. O patógeno.....	2
1.3. A Doença.....	6
1.4. Mecanismos de agressão de <i>Ralstonia solanacearum</i> .....	7
1.5. Epidemiologia.....	8
1.6. Controle .....	10
1.7. Resistência .....	12

### CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DE CULTIVARES E CLONES DE BATATA PARA RESISTÊNCIA À MURCHA BACTERIANA ( <i>Ralstonia solanacearum</i> , raça 1) .....	
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	17
2.1. Local e período da avaliação .....	17
2.2. Experimento 1: Avaliação da MB em cultivares de batata - Ano 2002 .....	17
2.3 Experimento 2: Avaliação da MB em cultivares de batata - Ano 2003 .....	17
2.4. Delineamento experimental.....	18
2.5. Progresso da murcha bacteriana.....	19
2.6. Produção de tubérculos em campo infestado.....	19
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20



3.1. Experimento 1: Avaliação da MB em cultivares de batata - Ano 2002 .....	20
3.2. Experimento 2: Avaliação da MB em cultivares de batata - Ano 2003 .....	26

### CAPÍTULO III

REAÇÃO À MURCHA BACTERIANA EM CLONES DE BATATA DA UNIVERSIDADE DE WISCONSIN E DA COLEÇÃO DO CIP .....	29
1. INTRODUÇÃO .....	29
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	32
2.1. Local da avaliação e delineamento utilizado .....	32
2.2. Experimento 1: Avaliação da resistência à MB em clones de <i>S. commersonii</i> .....	32
2.3. Experimento 2: Reação de genótipos da PTL do CIP à murcha bacteriana <sup>33</sup>	
2.3.1. Ensaio A: Avaliação em 2002 .....	34
2.3.2. Ensaio B: Avaliação em 2003 .....	34
2.4. Progresso da murcha bacteriana .....	34
2.5. Verificação de infecções latentes em tubérculos de plantas sem sintomas .....	37
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	38
3.1. Experimento 1: Avaliação da resistência à murcha bacteriana em clones de batata derivados de <i>Solanum commersonii</i> .....	38
3.2. Experimento 2: Reação de genótipos da PTL do CIP à murcha bacteriana .....	43
3.2.1. Ensaio A: Avaliação em 2002 .....	44
3.2.2. Ensaio B: Avaliação em 2003 .....	49
3.3. Verificação de infecções latentes em tubérculos de plantas sem sintomas .....	53

### CAPÍTULO IV

DESENVOLVIMENTO DE CLONES DE BATATA PARA RESISTÊNCIA À MURCHA BACTERIANA NA EMBRAPA HORTALIÇAS .....	55
1. INTRODUÇÃO .....	55
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	58
2.1. Desenvolvimento de novos clones de batata .....	58
2.1.1. Parentais resistentes: .....	58

2.1.2. Parentais com características agronômicas: .....	59
2.2. Obtenção de clones resistentes à murcha bacteriana .....	60
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	63

## CAPÍTULO V

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA À MURCHA BACTERIANA DE ACESSOS DA COLEÇÃO MUNDIAL DE <i>Solanum chacoense</i> .....	66
1. INTRODUÇÃO .....	66
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	69
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
APÊNDICES .....	87

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO III

- Tabela 1. Clones de batata provenientes da PTL do CIP e cultivares utilizadas na primeira avaliação de resistência à murcha bacteriana em condições naturais de infecção. Brasília-DF, 2002..... 35
- Tabela 2. Cultivares e clones de batata (*Solanum tuberosum*) avaliados quanto a resistência à murcha bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) em condições naturais de infecção. Brasília-DF, 2003..... 36
- Tabela 3. Número de amostras positivas para *Ralstonia solanacearum* avaliadas pelos testes NCM-ELISA e meio Kelman, obtidas de tubérculos de plantas sem sintomas de murcha bacteriana, de cultivares e clones plantados em área naturalmente infestada com o patógeno. Brasília-DF, 2003..... 54

### CAPÍTULO IV

- Tabela 1. Cruzamentos realizados na EPAGRI para desenvolvimento de clones de batata com boas características comerciais e resistentes à murcha bacteriana. São Joaquim-SC, 2002..... 60
- Tabela 2. Avaliação de progênie de batata quanto ao desempenho de características agronômicas na *Hayashi Batatas*. Brasília, 2003..... 61
- Tabela 3. Frequência de seleção dos clones de batata avaliados quanto a características comerciais em campo de produção da *Hayashi Batatas*. Brasília - DF, 2003..... 63

### CAPÍTULO V

- Tabela 1. Comportamento de genótipos de *Solanum chacoense* a diferentes estirpes de *Ralstonia solanacearum* avaliado pela porcentagem de plantas murchas. Brasília-DF, 2004..... 73

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO II

- Figura 1. Progresso da murcha bacteriana em cultivares de batata. Avaliação em campo naturalmente infestado com a biovar 1 de *Ralstonia solanacearum*. Brasília-DF, 2002. .... 22
- Figura 2. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em clones e cultivares de batata. Avaliação realizada em campo naturalmente infestado com a biovar 1 de *Ralstonia solanacearum*. Brasília-DF, 2002. (Tukey, 5%)..... 24
- Figura 3. Produção total de tubérculos de batata (*Solanum tuberosum* L.) em campo naturalmente infestado com a biovar 1 (raça 1) de *Ralstonia solanacearum*. Brasília-DF, 2002. Mesma letra nas colunas não difere significativamente pelo teste de Tukey (5%). ..... 25
- Figura 4. Progresso da murcha bacteriana em cultivares de batata. Avaliação em campo naturalmente infestado com a biovar 1 de *Ralstonia solanacearum*. Brasília-DF, 2003. .... 27
- Figura 5. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em clones e cultivares de batata. Avaliação realizada em campo naturalmente infestado com a biovar 1 de *Ralstonia solanacearum*. Brasília-DF, 2003. Mesma letra nas colunas não difere significativamente (Tukey, 5%)..... 28

### CAPÍTULO III

- Figura 1. Incidência e progresso da murcha bacteriana em genótipos de batata na Embrapa Hortaliças. Brasília-DF, 2002. .... 39
- Figura 2. Comportamento de genótipos de batata avaliados pela Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) em campo naturalmente infestado com a biovar 1 de *Ralstonia solanacearum*. Brasília-DF, 2002. .... 41
- Figura 3. Produção total de tubérculos de batata (*Solanum tuberosum*) em campo naturalmente infestado com raça 1 de *Ralstonia solanacearum*. Valores médios de cinco repetições de oito plantas. Brasília-DF, 2002. .... 43

- Figura 4. Progresso da murcha bacteriana (MB) em plantas de batata. Avaliação em campo infestado com *Ralstonia solanacearum*. A – Genótipos que manifestaram sintomas de MB antes de 37 dias após o plantio. B – Genótipos que apresentaram os sintomas de MB após 44 dias de cultivo. Brasília-DF, 2002. .... 46
- Figura 5. Reação de cultivares e clones de batata avaliados pela área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em campo naturalmente infestado com a biovar 1 de *Ralstonia solanacearum*. Brasília - DF, 2002. .... 47
- Figura 6. Produção total de tubérculos de batata em campo de murcha bacteriana. Brasília-DF, 2002. Letras diferentes indicam diferenças significativas no peso total de tubérculos (Tukey, 5%). .... 49
- Figura 7. Progresso da murcha bacteriana em genótipos de batata da coleção da PTL do CIP. A e B - Genótipos de maior suscetibilidade à murcha bacteriana em área infestada. C - Genótipos de suscetibilidade moderada e clones resistentes. Brasília-DF, 2003. .... 50
- Figura 8. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em genótipos da PTL do CIP. Avaliação em campo de murcha bacteriana. Brasília - DF, 2003. Letras diferentes indicam diferenças significativas (Tukey, 5%)..... 52

## AValiação DA RESISTÊNCIA DE CLONES E CULTIVARES DE BATATA À MURCHA BACTERIANA, *Ralstonia solanacearum*<sup>1</sup>

Autor: Artur Ferreira Lima Neto  
Orientador: Carlos Alberto Lopes

### RESUMO

Cultivares e clones de batata (*Solanum tuberosum* L.) foram avaliados de 2002 a 2004 na Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, para resistência à murcha bacteriana em campo naturalmente infestado com a raça 1, biovar 1 de *Ralstonia solanacearum*. Os testes de avaliação foram conduzidos com as cultivares atualmente mais plantadas no Brasil e com conjuntos de clones relatados como resistentes no Brasil e em outras partes do mundo. Em todos os experimentos, a doença foi avaliada pela incidência de plantas murchas em intervalos que permitiram a construção de curvas de progresso da doença para cada genótipo. A partir dessas, foram calculadas as áreas abaixo das curvas de progresso da doença (AACPD), valores usados para a realização das análises estatísticas por meio do programa SAS, que permitiram a comparação da resistência dos genótipos. Os genótipos mais resistentes nos ensaios foram os clones 'MB 03' e 'MB 9846-01', selecionados na Embrapa Hortaliças, e 'Cruza 148', padrão internacional de resistência originário do México. Nesses clones a incidência da doença ficou abaixo de 10%, 100 dias após o plantio. Dentre as cultivares, destacou-se 'Achat', com cerca de 30% de plantas murchas, valor significativamente superior ao dos clones acima mencionados, porém inferior ao das cultivares Monalisa, Atlantic, Bintje e Ágata, amplamente cultivadas no Brasil, e que apresentaram acima de 80% das plantas murchas. Observou-se que menores valores de AACPD correspondiam a um atraso no início do aparecimento dos sintomas da doença. Somente os clones 'MB 03' e 'Cruza 148' e a cultivar Achat apresentaram produção satisfatória devido à alta infestação do solo com o patógeno. Em outro experimento, 28 genótipos tidos como resistentes à murcha bacteriana e mantidos na Lista de Patógenos Testados (*Pathogen Tested List*) do Centro Internacional de la Papa (CIP), foram introduzidos *in vitro*, multiplicados em vasos em casa de vegetação e então avaliados em campo infestado com a biovar 1 de *R. solanacearum*. Os genótipos 'Mabondo' e 'BW 8' se destacaram nas condições avaliadas e poderão, juntamente com os clones MB-03, Cruza 148 e MB 9846-01, ser incluídos em programas de melhoramento com a finalidade de transferir genes de resistência para cultivares de batata. Os clones MB 03, 384515-1, MB 9721-01 e Cruza 148, anteriormente selecionados como resistentes na Embrapa Hortaliças, foram cruzados com as cultivares Monalisa, Baraka e Asterix para gerar genótipos que combinassem resistência e boas características agrônômicas. Dos 200 clones selecionados para tipo de tubérculos em campo comercial em Cristalina - GO, somente dois apresentaram bom desempenho quando cultivados em campo infestado na Embrapa Hortaliças, indicando que essa metodologia não é adequada para seleção de genótipos resistentes. Este resultado levou à recomendação da seleção para resistência como fase anterior à seleção para tipo de tubérculo de modo que não se eliminem genótipos com níveis satisfatórios de resistência. Adicionalmente foi avaliada a resistência à murcha bacteriana em 128 acessos da coleção mundial de *Solanum chacoense*, procedentes do Inter-Regional Potato Introduction, Sturgeon Bay, Madison, EUA. De 1.792 clones avaliados, seis foram selecionados como apresentando resistência à biovar 1 de *R. solanacearum*. Posteriormente, esses clones foram testados para outros isolados das biovars 1 e 2, procedentes de diferentes regiões do Brasil. Reação diferencial entre isolados e clones foram verificadas, mostrando que a resistência em *S. chacoense* é específica para diferentes estirpes do patógeno.

<sup>1</sup> Tese de Doutorado em Fitopatologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília. Brasília-DF, Brasil (93p.). Dezembro, 2005.

## ASSESSMENT OF RESISTANCE OF POTATO CLONES AND CULTIVARS THE BACTERIAL WILT, *Ralstonia solanacearum*<sup>1</sup>

Author: Artur Ferreira Lima Neto  
Adviser: Carlos Alberto Lopes

### ABSTRACT

Selected potato (*Solanum tuberosum* L.) clones and cultivars were screened from 2002 to 2004 in Brasília, DF, for resistance to bacterial wilt in a field naturally infested with race 1, biovar 1 or *Ralstonia solanacearum*. The objective of the experiment was to screen the most important cultivars grown in Brazil in comparison with clones previously selected as resistant at Embrapa Vegetables Experiment Station or elsewhere. In the field experiments, disease incidence was assessed in intervals which allowed the construction of disease progress curves for each genotype. The genotypes were statistically compared using the means of the values of the areas under the disease progress curves (AUDPC) calculated using a SAS program. The most resistant genotypes were clones MB-03 and MB 9846-01, previously selected at Embrapa Vegetables, and Clone 148, an international resistant reference from Mexico. All of them showed less than 10% wilt incidence 100 days after planting. Confirming previous results, 'Achat' was the most resistant cultivar, with 30% of disease incidence, a value statistically higher than those of the resistant clones. However, bacterial wilt incidence of 'Achat' at the end of the plant cycle was significantly lower than those of cultivars Monalisa, Atlantic, Bintje and Agata, with values always above 80%. It was observed that genotypes with lower values of the AUDPC presented symptoms later in the season as compared to susceptible genotypes. Because inoculum density was high in the experimental condition, yields were obtained only for 'Achat' and for the resistant clones. In another experiment, 28 genotypes indicated as resistant to bacterial wilt in CIP's Pathogen Tested List were introduced as *in vitro* plantlets, multiplied in pots in a greenhouse and then evaluated for resistance upon planting in the same naturally infested field in Brasília (race 1, biovar 1). Bacterial wilt incidence varied substantially among the genotypes, confirming the idea that screening for bacterial wilt resistance should be done locally. In this trial, only 'Mabondo' and 'BW 8' were comparable in terms of resistance to the clones selected at Embrapa Vegetables and can be also considered as important sources of resistance in breeding programs. In another experiment, clones MB 03, 384515-1, MB 9721-01 and Cruza 148, previously selected as resistant at Embrapa Vegetables, were crossed with cultivars Monalisa, Baraka and Asterix in order to combine resistance with acceptable tuber characteristics. From 200 clones selected for tuber characteristics in a disease-free commercial field at Cristalina, GO, only two survived when planted in the infested field in Brasília. This result indicated that screening to bacterial wilt should be done previously to for commercial characteristics in order to prevent loss of highly resistant clones that do not have good tuber appearance. Additionally, 128 accessions of the world collection of *Solanum chacoense*, originated from the the Inter-Regional Potato Introduction, Sturgeon Bay, Madison, WI, USA, were evaluated for bacterial wilt resistance (race 1, biovar 1) under greenhouse at Embrapa Vegetables. From 1,792 clones screened, only six were selected. These were later challenged with isolates of biovars 1 and 2 from distinct regions of Brazil. An interaction between isolates and clones indicated that resistance in *S. chacoense* is specific to different strains of *R. solanacearum*.

---

<sup>1</sup> Doctoral Thesis in Plant Pathology. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília. Brasília-DF, Brasil (93p.). December, 2005.

## CAPÍTULO I

### 1. INTRODUÇÃO

#### 1.1. A batata

Originária da América do Sul, a batata (*Solanum tuberosum* L.) já era consumida por populações nativas a mais de 10.000 anos (Engel, 1970). Foi introduzida na Europa no século XVI, por colonizadores espanhóis, tornando-se importante alimento a partir do século XVIII, principalmente na Inglaterra. Por volta de 1620, foi levada da Europa para a América do Norte, onde se tornou alimento popular. Atualmente, é o quarto alimento na ordem de importância no mundo, depois do trigo, do arroz e do milho. É um dos principais alimentos da humanidade, sendo cultivada em mais de 125 países e consumida por mais de um bilhão de pessoas (Choer, 2003).

No Brasil, a batata é considerada a principal hortaliça, tanto em área cultivada como em preferência alimentar. A área plantada anualmente aproxima-se de 136 mil hectares, sendo os estados da Região Sul e Sudeste os principais produtores (ABBA). Atualmente, o eixo de produção de batata tem se deslocado de áreas tradicionais para novas zonas de produção, com destaque para os estados de Goiás, Bahia e o Distrito Federal, onde a produtividade tem superado 40 ton·ha<sup>-1</sup>, bem acima da média nacional (15 ton·ha<sup>-1</sup>). A baixa ocorrência da murcha bacteriana nessas zonas de produção tem sido o principal fator para o bom rendimento da cultura.

O gênero *Solanum*, da família *Solanaceae*, contém mais de 2.000 espécies, embora somente cerca de 150 produzam tubérculos. A batata cultivada no Brasil pertence à espécie tetraplóide *Solanum tuberosum*. Esta espécie é dividida em duas subespécies, *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* e *S. tuberosum* subsp. *andigena*, sendo esta última cultivada somente nas regiões andinas. Por outro lado, as cultivares mais modernas de batata possuem em seu genoma várias características de outras espécies, como *S. demissum*, *S. chacoense* e *S. phureja*, adquiridas através de cruzamentos artificiais visando principalmente à incorporação de resistência a doenças (Fortes & Pereira, 2003).



## 1.2. O patógeno

*Ralstonia solanacearum* é uma bactéria gram negativa, aeróbica, bastonetiforme, habitante de solo, que apresenta um ou mais flagelos polares, pertencente à subdivisão  $\beta$  das proteobactérias, ordem Burkholderiales, família *Ralstoniaceae* (Genin & Boucher, 2002). Seu genoma é composto de dois replicons circulares constituídos de um cromossomo de 3,7 megabases (Mb) e um megaplasmídeo de 2,1 Mb, característica conservada em grande parte das estirpes analisadas (Salanoubat *et al.*, 2002). Pequenos plasmídeos de menos de 100 quilobases podem ser encontrados em algumas variantes e provavelmente estão relacionados à transferência lateral de genes de outras bactérias de solo (Genin & Boucher, 2002). O agente causal da murcha bacteriana foi descrito pela primeira vez por Smith, em 1896, como *Bacillus solanacearum*. O mesmo autor a reclassificou em 1914 como sendo do gênero *Pseudomonas*, espécie *P. solanacearum*. Com o advento de técnicas moleculares, o gênero *Pseudomonas* foi dividido em cinco grupos de espécies, onde a espécie *P. solanacearum*, pertencente ao grupo das não fluorescentes foi considerada como pertencente ao grupo II de homologia de rRNA do gênero *Pseudomonas* (Palleroni *et al.*, 1973). Em 1992, as espécies pertencentes a este grupo foram transferidas para o gênero *Burkholderia*, passando a espécie a ser chamada de *B. solanacearum* (basinômio: *P. solanacearum*) (Yabuuchi *et al.*, 1992). Três anos depois, baseado em características fenotípicas, na análise de lipídio celular e de ácidos graxos, e na análise filogenética da sequência de nucleotídeos de rDNA 16S e da homologia da rRNA-DNAS, a espécie foi reclassificada dentro da subclasse beta de *Proteobacteria* (Li *et al.*, 1993; Gillis *et al.*, 1995) no mesmo grupo II, mas como novo gênero, *Ralstonia*, distinta do grupo da espécie *Burkholderia cepacia* pela análise de homologia do DNA, passando a ser chamada de *R. solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* (Yabuuchi *et al.*, 1995).

*Ralstonia solanacearum* é uma espécie complexa, apresenta grande variabilidade, diferenciando em distribuição geográfica, propriedades fisiológicas, patogenicidade e círculo de hospedeiras. A variabilidade entre os isolados pode ser observada através de suas propriedades bioquímicas (Hayward, 1964); reações serológicas (Schaad *et al.*, 1978); proteínas de membrana (Dianese & Dristig, 1994);

homologia de DNA (Johnson & Palleroni, 1989); grupos RFLP (Cook *et al.*, 1989; Gillings & Fahy, 1993). O conhecimento da variabilidade é fator importante para estudos epidemiológicos da murcha bacteriana e, conseqüentemente, para seu controle. Assim, programas de melhoramento que busquem resistência à murcha bacteriana devem levar em consideração as variantes existentes nas regiões para as quais se destinam os materiais melhorados.

O agente causador da murcha bacteriana é extremamente variável, sendo adaptado a um grande número de plantas hospedeiras, sob as mais variadas condições. A bactéria está associada a mais de 200 espécies de plantas cultivadas e silvestres, em pelo menos, 50 famílias diferentes (Hayward, 2000). Culturas de importância econômica como: batata (*Solanum tuberosum*), tomate (*Lycopersicon esculentum*), banana (*Musa* spp.), fumo (*Nicotiana tabacum*), pimentão (*Capsicum annuum*), berinjela (*Solanum melongena*), pimenta (*Capsicum frutescens*), gengibre (*Zingiber officinale*) e amendoim (*Arachis hipogaea*), são afetadas pela murcha bacteriana. Outras culturas, como: algodão (*Gossypium hirsutum*), mandioca (*Manihot esculenta*), amora (*Morus alba*), *Eucalyptus* spp, *Anthurium* spp., além de diversas plantas daninhas, também são hospedeiras do agente da murcha bacteriana (Hayward, 1994; Miranda *et al.*, 2004).

*Ralstonia solanacearum* apresenta grande diversidade fenotípica. Isolados da bactéria obtidos de diferentes campos e em diferentes épocas frequentemente se comportam de maneira diferente, tanto em capacidade de provocar a doença como em se manter agressiva quando cultivada em meios de cultura em laboratório (Sequeira, 1994). Tradicionalmente, esses isolados são divididos em **raças**, com base na capacidade de atacar diferentes hospedeiras (Buddenhagen *et al.*, 1962), ou em **biovars**, com base na capacidade diferencial de usar açúcares e álcoois (maltose, lactose, celobiose, manitol, dulcitol e sorbitol) como fontes de carbono (Hayward, 1991). O sistema de classificação a nível infra-específico para *R. solanacearum* não é reconhecido pelo Código Internacional de Nomenclatura de Bactérias.

A raça 1 sobrepõe-se a divisão de biovars (Gillings & Fahy, 1993) e não constitui um agrupamento natural, mas compreende diferentes fenótipos com distintos genótipos e filogenia (Hayward, 1994). Estirpes da raça 1 caracterizam-se por afetar um

maior número de espécies hospedeiras, principalmente solanáceas. A raça 2 é patogênica a musáceas (bananeira triplóide e *Heliconia* sp.). A raça 3 é composta por estirpes que infectam basicamente a cultura da batata. Baseados neste mesmo critério, outros autores propuseram a adição de mais duas raças a este sistema de classificação. A raça 4 é característica de estirpes que afetam o gengibre e a raça 5, relatada na China, infecta plantas de amora (He *et al.*, 1983).

Quanto à classificação baseada em propriedades bioquímicas, inicialmente, quatro grupos de estirpes (biovars) foram identificados (Hayward, 1964). As estirpes das biovars 1 e 2 encontram-se amplamente distribuídas, sendo que a biovar 1 predomina em regiões de clima quente e caracteriza-se por afetar um maior número de espécies hospedeiras. A biovar 2 corresponde à raça 3 e predomina em regiões de clima temperado, sendo composta por estirpes que infectam basicamente a cultura da batata. A biovar 3 está mais adaptada às regiões quentes dos trópicos (Hayward, 1991). Estirpes pertencentes à biovar 4 normalmente correspondem a estirpes que infectam a cultura do gengibre (He *et al.*, 1983). Com a inclusão da biovar 5, encontrada na China infectando plantas de amoreira (*Morus alba*), atualmente, são conhecidas cinco biovars de *R. solanacearum* (He *et al.*, 1983).

A aparente homogeneidade das biovars pode diminuir com a adição de outros critérios fenotípicos, como foi demonstrado com isolados da biovar 2 mantidos na coleção do Centro Internacional de la Papa, em Lima, Peru (Hayward, 1994). Isolados da biovar 2, considerados previamente como homogêneos quanto a características fenotípicas, revelaram a existência de novos fenótipos quando adicionados os açúcares trealose, meso-inositol e D-ribose e certos ácidos orgânicos, bem como a determinação da atividade pectolítica e de redução de nitrato. Com base nestes critérios adicionais, novos fenótipos foram obtidos de isolados da biovar 2. Dois destes foram relacionados como biovar 2A e se diferenciaram em poucos critérios, apresentaram semelhanças genético-moleculares e foram considerados iguais à raça 3. O terceiro fenótipo é muito mais distinto dos demais pelos critérios adicionais, considerado mais ativo bioquimicamente bem como mais heterogêneo a nível molecular em relação ao genótipo e foram relacionados como biovar 2T. De acordo com French *et al.* (1993), os fenótipos patogênicos à batata, relacionados à raça 3 foram designados como biovar 2A

(A de andino) e as estirpes das áreas de baixa altitude da região tropical relacionados ao terceiro fenótipo mencionado anteriormente, foram designados de biovar 2T (T de tropical).

As estirpes de *R. solanacearum* patogênicas a batata são pertencentes às raças 1 e 3, estando presentes em áreas tradicionais de plantio no Brasil. A raça 3 (biovar 2) é mais freqüente nos estados do Sul e Sudeste, onde as temperaturas são mais amenas, ocasionando perdas consideráveis na produção da batata. As estirpes pertencentes à raça 1 (biovar 1), ocasionam basicamente doenças de solo e ocorrem em climas mais quentes. As biovars 4 e 5 ainda não foram detectadas no Brasil (Lopes, 2005).

Nos Estados Unidos a presença da biovar 1 é bastante freqüente nos estados da Carolina do Norte e Carolina do Sul, infectando plantas de tomate e fumo. Essa variante do patógeno também foi catalogada no Alabama, Arkansas, Flórida e Havaí. Introdução recente da biovar 2 (raça 3) foi verificada nos EUA procedentes de mudas de gerânio provenientes da Guatemala e Quênia (USDA, 2004). Em meados dos anos 90, isolados de *Ralstonia* adaptados a clima temperado foram encontrados no Leste Europeu, causando infecção latente em tubérculos de batata (Janse, 1996).

O sistema de classificação em raças e biovars não são correspondentes, com exceção da raça 3 que geralmente corresponde à biovar 2 (Hayward, 2000). Com base em técnicas moleculares (RFLP), as variantes da bactéria foram divididas em dois grandes grupos (divisões), de acordo com a distribuição geográfica. Geralmente, a divisão 1 corresponde as biovars 3, 4 e 5, sendo predominantes na Austrália e Ásia. As estirpes originárias das Américas pertencem à divisão 2 e correspondem as biovars 1, 2 e N2 (2T) (Cook & Sequeira, 1994; Seal *et al.*, 1999). Posteriormente, um terceiro grupo de estirpes originário da África, foi identificado (Poussier *et al.*, 2000).

Mais recentemente, foi proposto o sistema de classificação de *R. solanacearum* em **filotipos** (Fegan & Prior, 2005). Este sistema de classificação é baseado no agrupamento monofilético de estirpes revelado pela seqüência de dados, provindos da região ITS, do gene *hrpB* e do gene da endoglucanase. O filotipo I equivale à divisão 1 definida por Cook e Sequeira (1994) e inclui todas as estirpes pertencentes às biovars 3, 4 e 5. O filotipo II equivale à divisão 2 e inclui estirpes pertencentes às biovars 1, 2 e 2T, enquanto que o fitotipo III inclui os isolados africanos representados pelos

biovars 1 e 2T. O filotipo IV corresponde às estirpes isoladas da Indonésia pertencentes às biovars 1, 2 e 2T, além de incluir organismos relacionados como Blood Disease Bacterium (BDB) e *Pseudomonas syzygii*. A grande diversidade biológica de *R. solanacearum* contribui para a dificuldade encontrada ao manejo da doença, além de dificultar a obtenção de linhagens de plantas resistentes à murcha bacteriana no mundo. Fegan e Prior (2005) sugerem que *R. solanacearum* seja um complexo de espécies e não uma espécie única. Baseados na homologia DNA-DNA, propuseram uma nova classificação genética baseada em quatro níveis taxonômicos, equivalentes a espécies, subespécies, grupos infra-subespecíficos e linhagens clonais. Nessa nova proposta, o termo ‘filotipo’, que é identificado por PCR multiplex baseado na região ITS do cromossomo, é usado para designar grupos maiores no nível de subespécies. O termo “sequevar”, que é identificado pela análise de sequência de genes de endoglucanases, é usado para designar grupos infra-subespecíficos.

### 1.3. A Doença

A murcha bacteriana era conhecida por agricultores, no Japão, cerca de 200 anos antes da descrição do patógeno por Smith, em 1896 (Kelman *et al.*, 1994). A doença caracteriza-se pela perda da turgescência dos tecidos foliares e das partes mais suculentas dos ramos da planta. O sintoma inicia nas folhas mais novas e evolui para toda a planta. Inicialmente, uma só haste pode apresentar os sintomas e, persistindo-se condições favoráveis como temperatura elevada e alta umidade do solo, todas as folhas podem murchar completamente. A entrada do patógeno ocorre, geralmente, através de microferimentos, tais como os pontos nos quais emergem as raízes secundárias e células parcialmente esfoliadas da camada externa do parênquima (Saile *et al.*, 1997). As estirpes virulentas de *R. solanacearum* produzem grande quantidade de exopolissacarídeos (EPS). Os EPS contribuem para que as células bacterianas se mantenham agregadas, podendo causar a oclusão dos vasos e/ou prevenir o patógeno de ser reconhecido e imobilizado pelos componentes de resistência da planta tais como lecitinas, uma condição necessária para a indução da hipersensibilidade em interações incompatíveis (Trigalet-Demery *et al.*, 1993; Araud-Razou *et al.*, 1998). O bloqueio gradual dos vasos dificulta o transporte de água, causando o desequilíbrio hídrico da

planta que resulta no sintoma de murcha. Plantas infectadas produzem hastes e tubérculos com escurecimento vascular e exsudação de pus bacteriano. Podem apresentar também epinastia foliar e formação de raízes adventícias devido ao desequilíbrio de auxina e etileno (Buddenhagen & Kelman, 1964). Observa-se também, colonização bacteriana em células de parênquima e floemáticas do tecido de condução, resultando desta forma, na redução do transporte de água e a consequente expressão dos sintomas da doença (Vasse *et al.*, 1995, Vasse *et al.*, 2000; Hernández, 2005).

A murcha bacteriana pode se manifestar em qualquer estágio de desenvolvimento das plantas, dependendo principalmente do nível de infestação do solo, da cultivar, da contaminação da batata-semente, da disponibilidade de água no solo e da temperatura (Lopes, 2005).

#### **1.4. Mecanismos de agressão de *Ralstonia solanacearum***

Muitos produtos gênicos são necessários para *R. solanacearum* causar doenças aos hospedeiros. Três isolados em particular, K60 (Kelman, 1954), GMI1000 (Boucher *et al.*, 1985) e AW (Schell, 1987) foram utilizados para caracterizar os fatores de patogenicidade da bactéria. Estes estudos revelaram os principais mecanismos que a bactéria utiliza no processo de infecção, entre eles:

(i) Exopolissacarídeos e produção de enzimas extracelulares: *Ralstonia solanacearum* sintetiza uma variedade de produtos extracelulares que contribuem para colonizar os hospedeiros e causar os sintomas da doença. Um dos mais importantes é um polissacarídeo extracelular de alto peso molecular, o EPS I. Estudos com EPS I-mutante sugerem que o EPS I é a causa da murcha durante a infecção das plantas, por bloquear o sistema vascular e impedir o movimento de água (Denny & Baek, 1991; Kao *et al.*, 1992), além de reduzir ou evitar o reconhecimento da bactéria pelo sistema de defesa da planta hospedeira (Boucher & Genin, 2004). Em adição aos EPS, os isolados patogênicos de *R. solanacearum* secretam várias enzimas que degradam a parede celular da hospedeira. Estas incluem três poligalacturonases (PglA, PehB e PehC) (Huang & Allen, 1997; Schell *et al.*, 1988), uma endoglucanase (Egl) (Roberts *et al.*, 1988) e uma pectina metilesterase (Pme) (Tans-Kersten *et al.*, 1998). Porém, estas enzimas, possuem papel menor na patogenicidade, quando comparadas com o EPS I.

(ii) Genes *hrp*: são necessários à patogenicidade em espécies hospedeiras e indução de resposta hipersensível (HR) em plantas não-hospedeiras (Boucher *et al.*, 1987), sendo codificados pela via de secreção protéica Tipo III (TTSP) (Van Gijsegem *et al.*, 1993). A via Tipo III de patogênese é muito comum a bactérias, tanto em plantas como animais, sendo intensamente caracterizada a nível molecular.

(iii) Conversão fenotípica e regulação da virulência: a produção de determinantes virulentos de *Ralstonia solanacearum* é controlada por um complexo sistema regulatório que responde a múltiplos sinais (Schell, 2000). O principal agente deste sistema é o regulador transcricional *PhcA* (Brumbley *et al.*, 1993), envolvido no sistema de sensibilidade e densidade da célula *Phc*. *PhcA* ativa ambos os genes de virulência (biossíntese de EPS, *Pme* e exoproteína *Egl*) e reprime outros (envolvidos na motilidade, polygalacturonase e produção de sideróforo, genes *hrp*).

O sequenciamento completo do genoma de *Ralstonia solanacearum* (GMI1000) determinado recentemente torna-se o ponto de partida para se compreender toda a análise funcional e os determinantes de patogenicidade da bactéria (Salanoubat *et al.*, 2002).

## 1.5. Epidemiologia

Dentre os aspectos epidemiológicos da murcha bacteriana, a sobrevivência do patógeno em áreas infestadas, as formas de disseminação e o ambiente, em especial a temperatura, são os mais importantes. *R. solanacearum* é um patógeno tipicamente de solo, podendo sobreviver por extenso período de tempo na ausência de hospedeiros, em restos culturais, ou associada a plantas consideradas não hospedeiras ou daninhas (Hayward, 1991). De acordo com Takatsu & Lopes (1997), a maioria das plantas hospedeiras pode ser assintomática ou não suscetível e atuar como melhores mantenedoras da bactéria do que plantas suscetíveis.

Duas estirpes de *R. solanacearum* infectam a cultura da batata no Brasil. As estirpes da biovar 1, que correspondem à raça 1, com grande número de hospedeiros, maior capacidade de persistir no solo e predominar em regiões de clima quente, e as estirpes da biovar 2, correspondentes à raça 3, que infectam basicamente a batata em regiões de clima temperado e apresentam maior capacidade de produzir infecções

latentes (Hayward, 1991; Lopes, 2005).

Tradicionalmente considerado como um dos mais sérios patógenos da batata nas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo, *R. solanacearum* teve recentemente aumentada a sua importância mundial, já que na Europa ocorreram surtos da raça 3 (biovar 2A) em áreas de produção de batata na Suécia, Bélgica, França, Itália, Holanda, Portugal e Inglaterra (Elphinstone *et al.*, 1996, 1998). Outros países pertencentes à EPPO (European Plant Protection Organization) como Áustria, Bulgária, Finlândia, Grécia, Egito, Israel, Líbia, Marrocos, Polônia, Espanha, Romênia, Turquia e Ucrânia, também registraram a presença da raça 3 em zonas de produção ou a interceptaram em batata-semente contaminada (OEPP/EPPO, 1997). A erradicação da doença na União Européia tem sido dificultada pela associação do patógeno a uma espécie nativa (*Solanum dulcamara*) e pela disseminação da bactéria via água de irrigação (Elphinstone, 2005). A raça 3, patogênica à batata, foi relatada recentemente nos Estados Unidos em Wisconsin e Dakota do Sul, sendo o isolado procedente de plantas de gerânio cultivadas no Quênia e na Guatemala (Willianson *et al.*, 2002).

As infecções latentes são de particular importância na cultura da batata. Os tubérculos-semente infectados constituem a fonte de inóculo mais importante para a disseminação do patógeno. Embora alguns aspectos deste fato sejam conhecidos há muitos anos, a importância do período quarentenário pelo intercâmbio de material vegetal propagativo potencialmente capaz de carregar *R. solanacearum* tem sido subestimada. A disseminação da biovar 2 no mundo está associada a comercialização de tubérculos de batata, especialmente tubérculo-semente, nos quais populações latentes do patógeno podem colonizar os tecidos vasculares sem induzir sintomas da doença (Hayward, 1991).

De acordo com Lopes (1994), está bem documentado que *R. solanacearum* permanece em condição assintomática em lenticelas na superfície dos tubérculos e no tecido vascular da batata. Esta característica possui importante papel na determinação do inóculo primário na cultura e o seu risco pode aumentar em cultivares com maior grau de resistência por propiciar a disseminação do patógeno em um material aparentemente saudável. Em outras circunstâncias, a cultivar pode ser suscetível, porém a doença não se manifesta devido a baixas temperaturas e os sintomas só se expressam



quando os tubérculos colhidos são incubados ou plantados sob temperaturas favoráveis à expressão da doença (Hayward, 1991). Formas viáveis, mas não cultiváveis da bactéria (VBNC) podem estar relacionadas com infecções no campo, fato este demonstrado pela obtenção de células de *R. solanacearum* provenientes de plantas de tomateiro cultivadas em solo autoclavado contendo formas VBNC da bactéria (Grey & Steck, 2001). As técnicas DAS-ELISA (uso de anticorpo monoclonal específico associado ao enriquecimento prévio da amostra) e PCR também são eficazes na detecção de formas VBNC de *R. solanacearum*, com sensibilidade inferior a 100 células da bactéria/ml (Lópes *et al.*, 2003).

### 1.6. Controle

O agente etiológico da murcha pode infectar diversas hospedeiras sem causar sintomas. Sua habilidade em persistir de forma latente tem sido citada em muitas plantas daninhas (Hayward, 1991), linhagens de fumo, pimenta e tomate resistentes (Winstead & Kelman, 1952; Prior *et al.*, 1994; Lima Neto, 2001) e batata (Bowman & Sequeira, 1982; Prior *et al.*, 1990), o que sugere que a infecção latente é generalizada e comum na patogênese de *R. solanacearum*.

As infecções latentes são de particular importância na cultura da batata, e os tubérculos-semente infetados constituem a fonte de inóculo mais importante para a disseminação do patógeno (Hayward, 1991). De acordo com Lopes (1994), o comportamento das estirpes destes dois grupos (raças 1 e 3) é bastante diferente e leva à adoção de medidas diferenciadas para o manejo integrado da doença, sendo o controle mais satisfatório para as estirpes da biovar 2. A melhor forma de evitar o problema é assegurar que o solo e os tubérculos-semente utilizados para plantio estejam livres do patógeno (Elphinstone & Aley, 1993; Lopes, 1994).

O controle da murcha bacteriana é extremamente difícil, especialmente quando as condições ambientais são favoráveis à doença e também devido à complexidade que envolve a sobrevivência do patógeno no solo e sua ampla gama de hospedeiros. As possibilidades de sucesso no controle desta bacteriose dependem de vários fatores, tais como: variante do patógeno no local, modos de transmissão e de sobrevivência, tratamentos culturais, condição ambiental e grau de resistência da cultivar (Hayward, 1991). A

literatura não registra até o presente momento nenhuma solução universal satisfatória. Existem, sim, princípios que podem ser aplicados e adaptados a situações particulares de forma integrada.

Segundo Elphinstone & Aley (1993), a melhor forma de se evitar o problema é assegurar que o solo e a batata-semente utilizada no plantio estejam livres do patógeno. A produção de batata-semente em um sistema de certificação depende da produção de material de qualidade e comprovadamente livre do patógeno em áreas livres da doença e do estabelecimento de quarentena de modo a evitar a infestação de solos livres da bactéria.

O controle da murcha bacteriana só tem sido possível quando várias medidas complementares são observadas, dentro da estratégia de manejo integrado. Se a cultura se destina à produção de batata-consumo, é possível “conviver” com a doença, desde que ela seja bem monitorada e não atinja níveis de danos econômicos. Entretanto, no caso de batata-semente, esta convivência não é aceitável, visto que a legislação nacional de certificação de batata-semente prevê tolerância 0 (zero) para esta doença (Lopes, 2005).

Qualquer nível de resistência à doença tem se mostrado muito útil quando associado às outras práticas culturais, tais como: plantio em zonas livres do patógeno, plantios de inverno, uso de batata semente certificada, evitar terrenos sujeitos a encharcamentos e a utilização de rotação de culturas preferencialmente com gramíneas (French, 1994). Embora incomum, cultivares que não foram melhoradas para resistência à murcha bacteriana apresentam consistentemente menor grau de ataque da doença. Isto pode ser explicado, pelo menos em parte, pelo fato de a resistência ser relacionada à adaptabilidade da cultivar a uma determinada região (Lopes *et al.*, 2004). No Brasil, a cultivar alemã Achat tem se sobressaído, com grau de resistência satisfatório quando comparada com cultivares estrangeiras amplamente plantadas, como Ágata, Monalisa, Atlantic e Bintje, ou mesmo com as cultivares nacionais Baronesa, Catucha, Contenda e Cristal, selecionadas na Região Sul, onde a doença é endêmica (Lopes *et al.*, 2004). A resistência de ‘Achat’ mostrou-se estável, independente da prevalência da raça (1 ou 3) no local avaliado, sendo por isso a cultivar com menor incidência de rejeição em campos de produção de batata-semente em

levantamentos feitos na Região Sudeste do Brasil (Silveira, 2002). Entretanto, o não florescimento da cultivar Achat impede que a mesma seja utilizada em programas de melhoramento visando à obtenção de genótipos resistentes e, ao mesmo tempo, com boas características de tubérculos (Lopes *et al.*, 1998).

Desde o início da década de 1980, outras fontes de resistência à doença foram buscadas em genótipos derivados de cruzamentos realizados no Centro Internacional de la Papa (CIP), em que pelo menos um dos genitores era resistente, geralmente encontrados em espécies não cultivadas do gênero *Solanum*, como *S. phureja*, *S. sparsipilum*, *S. chacoense* e *S. microdontum* (Priou *et al.*, 2000). Desses cruzamentos, foi possível selecionar clones com alto grau de resistência à doença sem, entretanto, se obter imunidade, que dispensasse outras formas de controle (Priou *et al.*, 2005). Além disso, o aspecto visual desses clones geralmente não é atrativo, o que leva à necessidade de se realizar uma seleção prévia para tipo de tubérculo antes de se avaliar para resistência à doença. Deste modo, o material selecionado pode ser usado como genitor em programas de melhoramento, que visam principalmente o aspecto visual do produto (Lopes *et al.*, 2004).

O desenvolvimento de plantas transgênicas, contendo um gene que sintetiza um peptídeo anti-bacteriano, tem sido uma das formas estudadas para se controlar a murcha bacteriana em plantas de batata na China (Jia *et al.*, 1998; Boshou, 2005).

### **1.7. Resistência**

Dentre as estratégias para o controle de *R. solanacearum*, a utilização de cultivares resistentes é considerada a mais importante (Hayward, 1991). No entanto, a resistência genética não tem demonstrado estabilidade em relação ao tempo e ao local, principalmente devido à variabilidade genética das estirpes do patógeno e por alterações climáticas das diferentes regiões geográficas (Tung *et al.*, 1990). Deste modo, justifica-se o estabelecimento de programas de melhoramento em áreas específicas, levando-se em consideração as estirpes prevalentes em cada local (Lopes & Giordano, 1983; Lopes *et al.*, 2004).

Em batata, a maioria das fontes de resistência à murcha bacteriana é originada de clones de *Solanum phureja*, uma espécie cultivada diplóide (French *et al.*, 1998).

Híbridos resistentes de *Solanum phureja* x *S. tuberosum* foram testados em muitos países, sendo que no Peru foram lançadas as cultivares Coxamarca e Molinera (Ciampi *et al.*, 1980). A maior dificuldade observada em relação à progênie de *S. phureja*, foi a manutenção da resistência, já que esta pode ser quebrada por temperaturas acima de 30 °C (Rowe & Sequeira, 1970). Uma resistência específica a determinadas estirpes do patógeno e instável em relação ao ambiente pode favorecer a disseminação do patógeno por tubérculos sem sintomas (infecção latente).

De acordo com Rowe & Sequeira (1970) a resistência em *S. phureja* é controlada por três genes dominantes e independentes. Posteriormente, Rowe *et al.* (1972) concluíram que relativamente poucos genes estavam envolvidos na resistência, em um sistema pelo menos parcialmente inter-relacionado, ainda que aparentemente específico para certas estirpes do patógeno. Os trabalhos de Tung *et al.* (1990) e Tung *et al.* (1992) avaliaram não só os genes de resistência, mas também genes que conferem adaptação ao ambiente. Concluíram que a resistência em batata é poligênica e que são necessários genes de adaptação ao ambiente para a expressão efetiva da resistência à murcha bacteriana. Resistência a estirpes específicas, entretanto, parece ser característica de *S. phureja*. Programa de melhoramento foi implementado no CIP na década de 1980 com genes de resistência de diversas espécies diplóides de *Solanum*, incluindo *S. phureja*, *S. sparsipilum*, *S. chacoense*, *S. microdontum* e *S. raphanifolium*. É provável que a base genética para resistência seja diferente em cada espécie, possibilitando que a resistência nas novas linhagens possa ser controlada poligenicamente. Entretanto, não há informações sobre os padrões de herança da resistência das espécies individuais (Elphinstone, 1994). Adicionalmente cruzamentos com essas espécies geraram clones de aparência indesejável, o que dificultava a obtenção de clones com aceitação comercial. A avaliação de híbridos somáticos de *Solanum phureja* e *Solanum stenotomum* mostrou que estas espécies se comportaram como boas fontes de resistência à murcha bacteriana, quando submetidas a infecções das biovars 2 e 3 (raças 3 e 1, respectivamente) de *R. solanacearum* (Fock *et al.*, 2005).

Atualmente, resistência genética parcial está disponível somente na cultivar alemã Achat. No entanto, no Brasil esta cultivar foi substituída gradualmente por

cultivares mais suscetíveis, devido a sua baixa qualidade culinária e aspecto visual dos tubérculos (Reifschneider & Lopes, 1997; Lopes, 2005). ‘Achat’ não floresce nas nossas condições, o que impossibilita a sua utilização em programas convencionais de melhoramento (Lopes *et al.*, 2004).

No Brasil, o desenvolvimento de cultivares resistentes a *R. solanacearum* vem sendo realizado na Embrapa Hortaliças, iniciado em um projeto conjunto com o Centro Internacional de la Papa (CIP). A Embrapa Hortaliças vem selecionando genótipos para resistência à murcha bacteriana a partir de clones obtidos de sementes verdadeiras de batata, originadas de cruzamentos de várias espécies de *Solanum*, portando diferentes genes de resistência. Os clones são selecionados para características comerciais e, posteriormente, semeados em uma área naturalmente infestada com a biovar 1 (raça 1) de *R. solanacearum*. A resistência dos clones é avaliada pela área abaixo da curva de progresso da doença, sendo considerados padrões de resistência as cultivares Achat e Cruza 148 e de suscetibilidade, a cultivar Monalisa (Lopes *et al.*, 1998; Lopes *et al.*, 2004).

## CAPÍTULO II

### AVALIAÇÃO DE CULTIVARES E CLONES DE BATATA PARA RESISTÊNCIA À MURCHA BACTERIANA (*Ralstonia solanacearum*, raça 1)

#### 1. INTRODUÇÃO

A murcha bacteriana, causada por *Ralstonia solanacearum*, é uma das doenças mais destrutivas da batata (*Solanum tuberosum*) no Brasil e em outros países de clima tropical e subtropical. É responsável por perdas elevadas na produção de batata-consumo e pela condenação de campos de certificação de batata-semente. A doença pode ocorrer em todas as regiões produtoras de batata, principalmente em cultivos sujeitos a alta temperatura e umidade. No Brasil, é mais freqüente em plantios localizados entre as latitudes 20° a 32° S (Lopes *et al.*, 1998), e em algumas regiões, a bactéria está associada à microflora nativa do solo.

Dentre as estratégias para o controle da murcha bacteriana, a utilização de cultivares resistentes é considerada a mais importante. Entretanto, a resistência genética tem demonstrado instabilidade em virtude da variabilidade das estirpes do patógeno nos diferentes locais e por alterações do ambiente, principalmente de temperatura nas diferentes regiões climáticas. Em locais em que as temperaturas são mais elevadas, a resistência pode ser superada por estirpes específicas do patógeno (Tung *et al.*, 1992).

No Rio Grande do Sul, Silveira (2002) verificou que as cultivares de batata Baraka, Baronesa, Bintje, Catucha, Clone A, Contenda, Fina, Granola, Monalisa e Rheinhort foram suscetíveis à murcha bacteriana (biovar 2), e que os clones MB 03 e Cruza 148 foram os que apresentaram maior grau de resistência à doença. Com relação ao progresso da murcha bacteriana, o modelo logístico foi o mais adequado para explicar a epidemia ocorrida nas cultivares de batata.

A curva de progresso da doença reflete a intensidade através do tempo em que ocorre a epidemia. Sua representação é a integração existente entre o hospedeiro, o patógeno e os efeitos do ambiente, que ocorre durante o desenvolvimento da doença. Isto constitui uma oportunidade para analisar, comparar e entender a epidemia vegetal

(Campbell & Madden, 1990). Modelos matemáticos que expressam a relação existente entre a doença e o tempo podem ser utilizados para comparação de epidemias de uma mesma doença em diferentes épocas ou locais, ou mesmo, para comparar diferentes doenças. Os modelos obtidos pelas curvas de progresso da doença podem ser linearizados e a inclinação destas linhas utilizadas para avaliar cultivares com diferentes níveis de resistência (Neher *et al.*, 1997).

As cultivares de batata mais plantadas no Brasil, sejam estrangeiras ou nacionais, são como altamente suscetíveis à murcha bacteriana. O conhecimento do comportamento da doença nos diferentes estádios de desenvolvimento da cultura é fator fundamental para auxiliar no manejo da epidemia, bem como determinar a época crítica para o desenvolvimento da doença nas principais cultivares atualmente utilizadas. Os genótipos utilizados nos programas de resistência à murcha bacteriana também apresentam comportamento epidemiológico diferenciado em relação às cultivares, em todas as fases de desenvolvimento.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o progresso da murcha bacteriana nas principais cultivares de batata atualmente plantadas no Brasil em comparação com clones resistentes selecionados nos últimos anos na Embrapa Hortaliças.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Local e período da avaliação**

Os diferentes genótipos de batata foram avaliados durante dois anos. O primeiro ensaio foi instalado em 15 de julho de 2002 e o segundo em 29 de junho de 2003. A área utilizada na experimentação na Embrapa Hortaliças, é naturalmente infestada com a raça 1, biovar 1, de *Ralstonia solanacearum*. A Embrapa Hortaliças está localizada no núcleo rural de Ponte Alta, Brasília-DF, e possui como coordenadas geográficas os pontos 15° 56' latitude Sul e 48° 08' longitude Oeste. A altitude do terreno é de 997 metros. A região caracteriza-se pelo clima tropical com duas estações bem definidas, sendo uma seca (junho a setembro) e outra chuvosa (outubro a maio).

### **2.2. Experimento 1: Avaliação da murcha bacteriana em cultivares de batata - Ano 2002**

O ensaio foi instalado em campo naturalmente infestado na Embrapa Hortaliças no ano agrícola de 2002. A área escolhida para a experimentação é exclusiva para a avaliação do desempenho de cultivares e clones de batata para murcha bacteriana e vem sendo utilizada pelo programa de melhoramento há cinco anos. A manutenção da quantidade de inóculo no local foi promovida pelo sucessivo plantio de plantas suscetíveis à murcha bacteriana e à manutenção de plantas invasoras, que em sua maioria abriga hospedeiras de *R. solanacearum*.

Nesta avaliação foi observado o comportamento das cultivares: Achat, Asterix, Atlantic, Bintje, Catucha e Monalisa. Estes materiais se caracterizam por apresentar boas características agrônômicas, umas com potencial para fritura (Asterix e Atlantic), outras melhor aproveitadas para cozimento (Monalisa, Achat, Catucha e Bintje). A cultivar Monalisa foi utilizada como padrão de suscetibilidade.

### **2.3 Experimento 2: Avaliação da murcha bacteriana em cultivares de batata - Ano 2003**

Este ensaio foi instalado no ano agrícola de 2003 na mesma área utilizada para o experimento anterior. Foram avaliados os mesmos genótipos plantados anteriormente,



com exceção de ‘Atlantic’ que foi substituída pela cultivar Ágata, que é atualmente a cultivar mais plantada no Brasil. Sua produtividade é considerada excelente, tendo ciclo precoce, pele amarela e brilhante, polpa amarela clara e brotação rápida, características que contribuem para sua consolidação no mercado. Devido a estes fatores, decidiu-se acrescentar esta cultivar na observação do ano agrícola de 2003. A cultivar Monalisa foi novamente utilizada como padrão suscetível.

Para as duas avaliações foram utilizados como padrões de resistência os clones ‘MB 03’ e ‘Cruza 148’. O clone ‘Cruza 148’ é um dos padrões internacionais de resistência à murcha bacteriana (Priou *et al.*, 2005). Apesar de resistente, este clone não tem sido utilizado em programas de melhoramento devido a sua má aparência e baixa qualidade de tubérculo, características que são transmitidas à sua progênie. O clone ‘MB 03’ foi selecionado na Embrapa Hortaliças a partir do cruzamento de BR 63-76 x XY-9 realizado pelo CIP (Lopes *et al.*, 1998). Em avaliações anteriores realizadas pela Embrapa Hortaliças, o clone ‘MB 03’ tem apresentado excelente desempenho de resistência à murcha bacteriana. Outra característica importante deste clone é possuir aparência superior ao padrão internacional de resistência.

#### **2.4. Delineamento experimental**

Em ambos os experimentos foram utilizados o delineamento em blocos casualizados com parcelas de oito plantas e cinco repetições. O espaçamento entre fileiras foi de 0,8 m (parcelas) e 0,3 m entre plantas. Para melhor uniformidade e padronização dos experimentos, os quarenta tubérculos de cada genótipo utilizados nas avaliações foram selecionados por tamanho e brotação uniforme. Outra característica imprescindível para este tipo de avaliação é a obtenção de batata-semente originária de locais livres da murcha bacteriana e outras doenças importantes da batata, principalmente viroses. Para isto, as batatas-sementes utilizadas nos ensaios foram produzidas em solo esterilizado (autoclave) sob condições controladas em casa de vegetação.

## **2.5. Progresso da murcha bacteriana**

O número de plantas com sintomas de murcha (incidência) foi registrado a partir da primeira ocorrência e a partir desses valores calculou-se a Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) para cada cultivar ou clone, segundo metodologia proposta por Shaner e Finney (1977). A identificação bioquímica das estirpes de *R. solanacearum* encontradas na área experimental foi realizada no laboratório de fitopatologia da Embrapa Hortaliças, seguindo metodologia descrita por Hayward (1991).

As avaliações foram feitas a cada três dias a partir do início do aparecimento dos sintomas, de modo a acompanhar o progresso da doença ao longo do tempo. Para cada avaliação foi registrado o número de plantas com sintomas de MB. Foram realizadas onze avaliações da incidência da doença em cada experimento e então construídas as curvas de progresso da doença para cada genótipo. A verificação da distribuição normal e o agrupamento das médias foram realizados utilizando o programa estatístico SAS. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

## **2.6. Produção de tubérculos em campo infestado**

Ao final da avaliação de resistência à murcha bacteriana procedeu-se a colheita total dos tubérculos produzidos pelos genótipos de batata nas diferentes repetições. Os valores de produção são referentes à média das oito plantas de cada repetição (parcela). Para esta variável avaliada também se utilizou o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade na comparação das médias.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizadas onze avaliações de incidência de plantas com murcha bacteriana, com início em 26 de agosto de 2002 e término em 17 de outubro de 2002, para o primeiro período, e início das observações em 07 de julho de 2003 e término em 24 de agosto de 2003 para o segundo período. Plantas que apresentaram sintomas da doença foram coletadas e levadas ao laboratório de fitopatologia da Embrapa Hortaliças para verificação da presença de *Ralstonia solanacearum*. Testes bioquímicos constataram a presença de estirpes da biovar 1, confirmando assim, o histórico bioquímico dos isolados coletados naquela localidade. A presença de plantas murchas foi bastante uniforme nas diferentes repetições do ensaio experimental. A quantidade natural de inóculo no local da experimentação contribuiu para a boa representatividade de doença, minimizando ao máximo a possibilidade de escape nas plantas assintomáticas. A “pressão de inóculo” no local é promovida pelo sucessivo plantio de cultivares suscetíveis à murcha bacteriana.

A análise exploratória para verificação da normalidade dos dados relativos à AACPD e incidência de murcha bacteriana indicou que as observações possuem distribuição normal para os dois períodos, permitindo que os dados fossem submetidos à análise de variância.

#### **3.1. Experimento 1: Avaliação da murcha bacteriana em cultivares de batata - Ano 2002**

As cultivares Monalisa, Atlantic, Bintje e Catucha manifestaram sintomas de murcha bacteriana 35 dias após o plantio, sendo os primeiros genótipos a apresentarem plantas doentes. A precoce suscetibilidade apresentada por estas cultivares expressou-se como maior porcentagem de plantas murchas ao final da avaliação (Figura 1). Passados 55 dias de cultivo estes genótipos apresentavam mais de 90% de plantas afetadas pela murcha bacteriana, apresentando diferença significativa em relação aos demais tratamentos. Esses resultados corroboram os obtidos no Sul do Brasil por Silveira (2002) que verificou extrema suscetibilidade à biovar 2 de *R. solanacearum* nas cultivares Monalisa, Catucha e Bintje. Este resultado mostra ainda, que independente

do local avaliado e da estirpe da bactéria encontrada, estas cultivares se mostram inadequadas ao plantio sob condições favoráveis ao desenvolvimento da doença na presença do patógeno.

A cultivar Asterix embora tenha se comportado como suscetível, apresentou resistência à doença em sua fase inicial. As plantas de ‘Asterix’ apresentaram desenvolvimento mais acentuado da doença somente aos 47 dias após o plantio, mas mesmo assim, devido ao alto potencial de multiplicação do patógeno associado a condições de resistência do genótipo, a incidência final de murcha bacteriana para este tratamento situou-se em torno de 65%. Esta resistência inicial na cultivar deve ser caracterizada uma vez que resistência em materiais comerciais de batata somente seria possível com a utilização de quantidades maiores de genes de resistência, tendo em vista o caráter poligênico associado à manifestação da doença (Tung *et al.*, 1990).

A cultivar Achat destacou-se como moderadamente resistente, colocando-se em posição intermediária entre os mais suscetíveis e os materiais que apresentaram elevada resistência. Nesta cultivar os sintomas expressaram-se mais tardiamente (após 40 dias) e ao final do ciclo apresentava 35% de plantas doentes. Durante a década de 90, essa cultivar foi bastante utilizada no Brasil, sendo que uma de suas características favoráveis à sua preferência se devia ao fato deste material apresentar resistência satisfatória à murcha bacteriana, associada ao bom potencial produtivo deste genótipo (Lopes *et al.*, 1998). Gradualmente, a cultivar Achat, foi substituída por outros genótipos de batata mais produtivos, como o caso das cultivares Ágata, Mondial, ou adequados a um nicho específico de mercado, como a cultivar Atlantic (ABBA, 2005).

A moderada resistência de Achat é muito interessante tendo em vista que esse material foi obtido do cruzamento das cultivares Fina e Rheinhort (Hamester & Hills, 1999). As cultivares Fina e Rheinhort mostraram-se mais suscetíveis que “Achat” quando avaliadas para a biovar 2 (raça 3) de *R. solanacearum*, sendo “Rheinhort” a mais suscetível entre doze cultivares testadas (Silveira, 2002). Em estudo realizado nas condições do Brasil Central, a cultivar Rheinhort também mostrou-se suscetível a biovar 1 (raça 1) de *R. solanacearum* em condições naturais de infecção (Quezado-Soares *et al.*, 1997). Segundo Rieseberg *et al.* (2003), a resistência de uma progênie obtida de genitores suscetíveis é explicada pela combinação adequada de genes de

resistência parcial (segregação transgressiva). Há de se considerar também a proposta de Tung *et al.* (1990) e Tung *et al.* (1992), que avaliaram não só genes de resistência, mas também genes que conferem adaptação ao ambiente. De acordo com esses autores, a resistência à murcha bacteriana em batata é governada por genes de “efeito menor”, sendo necessária uma combinação adequada de genes de resistência e de genes de adaptação ao ambiente para uma expressão efetiva da resistência. A falta de florescimento da cultivar Achat impossibilita que os genes desta cultivar possam ser transferidos, via melhoramento clássico, para outras cultivares mais suscetíveis e que apresentem melhor desempenho agrônômico.

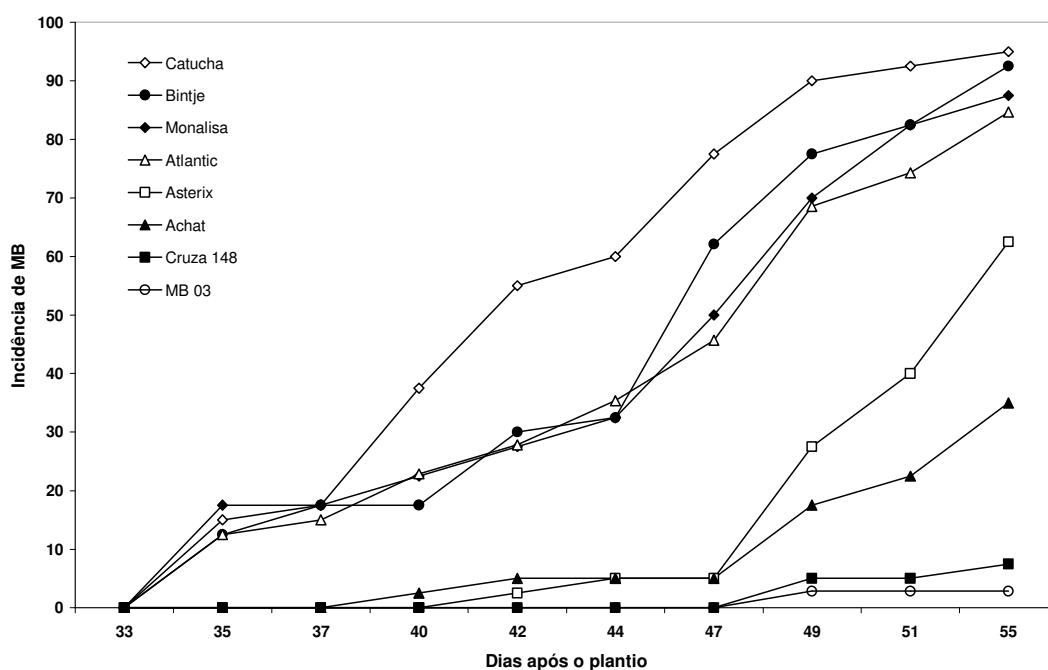


Figura 1. Progresso da murcha bacteriana em cultivares de batata. Avaliação em campo naturalmente infestado com a biovar 1 de *Ralstonia solanacearum*. Brasília-DF, 2002.

Os clones de batata ‘MB 03’ e ‘Cruza 148’ foram os genótipos que apresentaram melhor desempenho, sendo considerados altamente resistentes à doença nas condições experimentadas. Nestes materiais, a murcha bacteriana foi identificada após os 49 dias de cultivo, ou seja, 15 dias após os sintomas se manifestarem nas outras cultivares. Ao final do período de avaliação os clones ‘Cruza 148’ e ‘MB 03’

apresentavam respectivamente, 7,5 e 5,7% de plantas murchas, incidência muito inferior aos demais genótipos.

O clone Cruza 148 é utilizado em praticamente todo o mundo como padrão internacional de resistência à murcha bacteriana (Lopes *et al.*, 1998). Estudos já demonstraram, que seu desempenho como “doador” de genes não é dos melhores, tendo em vista, que este material transmite boa parte de suas características indesejáveis (tubérculos arroxeados, elevada quantidade de “olhos” profundos e arquitetura desfavorável), sem transmitir resistência considerável à murcha bacteriana para sua progênie (Tung *et al.*, 1990).

O clone ‘MB 03’, foi selecionado pelo programa de melhoramento da Embrapa Hortaliças em 1997 a partir de cruzamentos realizados no CIP e, desde então, vem sendo avaliado para resistência à murcha bacteriana (Lopes *et al.*, 1998). Este material apesar de não apresentar boas características agronômicas, está sendo utilizado pelo programa de melhoramento genético da Embrapa Hortaliças, por apresentar, além de ótima resistência à murcha bacteriana, tubérculos com melhor aspecto comercial em relação ao padrão internacional de resistência, o clone Cruza 148. O bom florescimento de ‘MB 03’ é fator importantíssimo no desenvolvimento futuro de cultivares de batata que expressem resistência à doença.

Como esperado, a maior suscetibilidade das cultivares em relação aos clones testados também foi verificada analisando-se os valores de AACPD ( $Pr < 0,001$ ). Quanto maior a AACPD mais suscetível é o genótipo avaliado. Os valores da AACPD para cada tratamento, em cada período observado, mostraram-se mais adequados para a avaliação de resistência à murcha bacteriana devido ao fato desta característica representar a integração resultante entre a quantidade de doença no momento da avaliação em relação à variável tempo (Figura 2).

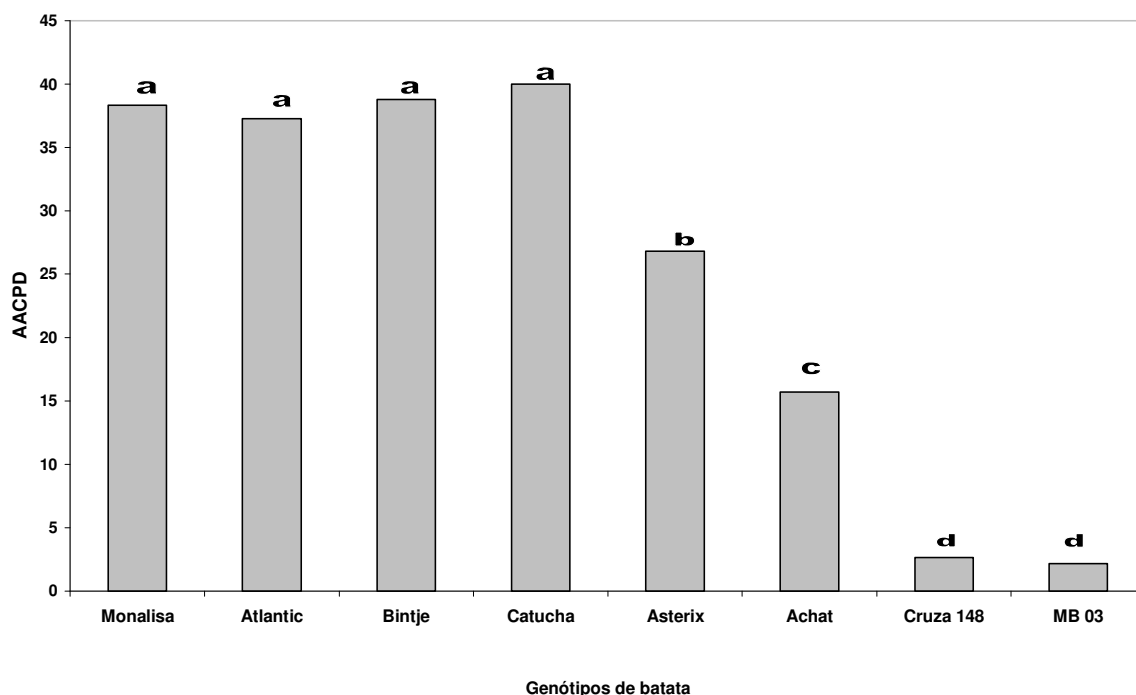


Figura 2. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em clones e cultivares de batata. Avaliação realizada em campo naturalmente infestado com a biovar 1 de *Ralstonia solanacearum*. Brasília-DF, 2002. (Tukey, 5%)

Após as avaliações de resistência dos materiais testados, procedeu-se a colheita dos tubérculos produzidos pelas diferentes cultivares e clones de batata. As avaliações da produção apresentada pelos genótipos testados mostraram a importância da época da primeira manifestação dos sintomas na redução de produtividade das plantas de batata. Os genótipos que apresentaram maior resistência também foram os que mostraram maior produção de tubérculos. Infecções precoces de murcha bacteriana resultam em morte da planta de batata antes mesmo que esta tenha começado a formar tubérculos. Em infecções tão severas como ocorridas no ensaio experimental, os tubérculos produzidos são afetados tanto quantitativamente, como em qualidade, impossibilitando desta forma seu consumo.

Maior produção total de tubérculos foi apresentada pelo clone Cruza 148 e pela cultivar Achat, que formaram um grupo significativamente diferente de 'MB 03' e das demais cultivares de batata (Figura 3). Os genótipos que apresentaram produção satisfatória foram os que tiveram infecções de *Ralstonia solanacearum* mais

tardiamente. Embora ‘Achat’ tenha apresentado menor resistência que o clone ‘Cruza 148’ seu maior potencial produtivo compensou a influência da presença da murcha bacteriana sobre a produção. A menor produção do clone de ‘MB 03’ em relação ao padrão internacional de resistência (Cruza 148) deve-se à sua menor capacidade de formar tubérculos, indicando que este clone necessita ser cruzado com genótipos produtivos e adaptados.

Infecções tardias resultaram em plantas com maior potencial produtivo frente à interferência do patógeno. Em contrapartida, os genótipos que apresentaram infecções precoces, representados pelas cultivares Bintje, Catucha, Atlantic e Monalisa, apresentaram produtividades irrisórias, e em alguns casos, sequer chegaram a produzir tubérculos.

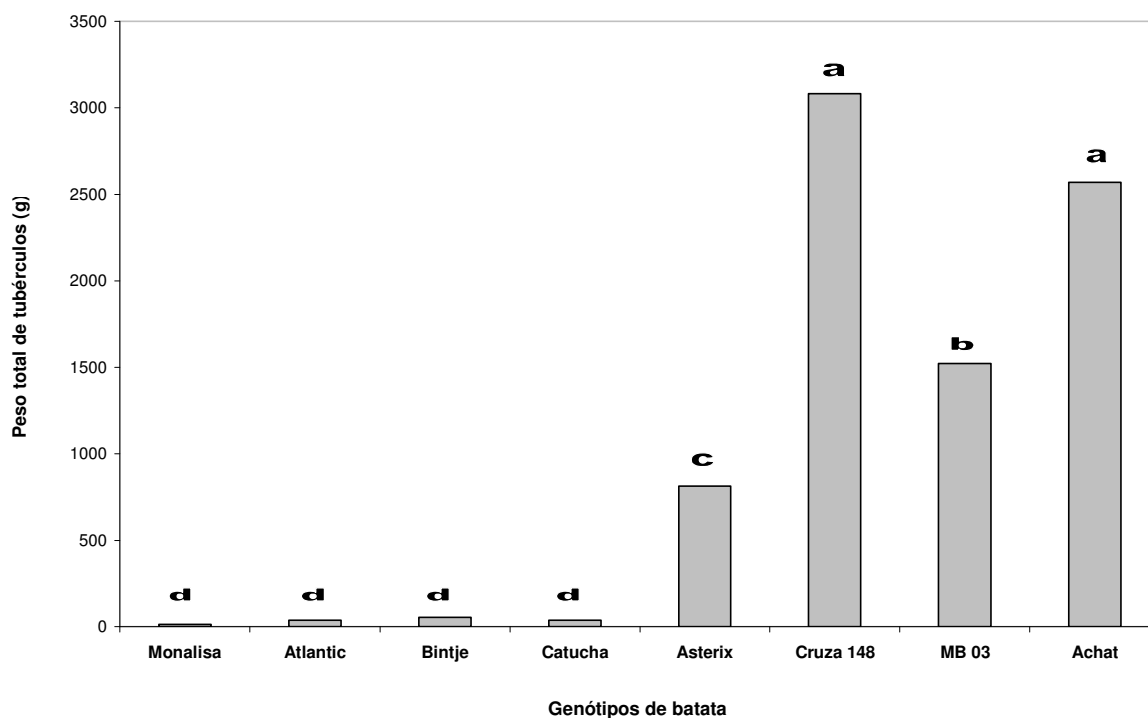


Figura 3. Produção total de tubérculos de batata (*Solanum tuberosum* L.) em campo naturalmente infestado com a biovar 1 (raça 1) de *Ralstonia solanacearum*. Brasília-DF, 2002. Mesma letra nas colunas não difere significativamente pelo teste de Tukey (5%).



### **3.2. Experimento 2: Avaliação da murcha bacteriana em cultivares de batata - Ano 2003**

Para esta avaliação foram utilizados os mesmos procedimentos adotados no experimento do ano anterior, como número de avaliações, verificação da incidência da murcha bacteriana e cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). Uma diferença foi à substituição de ‘Atlantic’ pela cultivar Ágata, material que hoje domina o mercado de batata, e cuja reação à murcha bacteriana, não é perfeitamente compreendida.

A presença de plantas murchas foi bastante uniforme nas diferentes repetições do ensaio experimental. A quantidade e a distribuição de inóculo no local da experimentação contribuíram para a boa representatividade da doença, minimizando ao máximo a possibilidade de escape nas plantas sem sintomas.

A análise exploratória para verificação da normalidade dos dados relativos à AACPD e incidência de murcha bacteriana indicou que as observações possuem distribuição normal, permitindo que os dados fossem submetidos à análise de variância.

Em relação ao período anterior (2002), os sintomas de murcha bacteriana surgiram um pouco mais tarde, em média cinco dias a mais. Novamente as cultivares Catucha, Bintje e Monalisa apresentaram extrema suscetibilidade à murcha bacteriana, formando junto com a cultivar Ágata um grupo altamente suscetível. Com exceção de ‘Ágata’, que apresentou os primeiros sintomas de murcha 43 dias após o plantio, todas as demais cultivares suscetíveis manifestaram a presença da bactéria uma semana antes (37 dias após o plantio). Nos tratamentos suscetíveis, a evolução da murcha bacteriana caracterizou-se por apresentar muita rapidez, tendo em vista que os intervalos entre as observações realizadas foram bastante reduzidos, entre 3 e 5 dias. Os sintomas ocorreram em todas as repetições do experimento e o escape em plantas suscetíveis foi mínimo. As cultivares testadas com exceção de ‘Asterix’ e ‘Achat’ apresentaram mais de 70% de plantas murchas, diferenciando significativamente dos clones resistentes (Figura 4).

A cultivar Asterix, embora não tenha mostrado resistência satisfatória, apresentou uma menor evolução da doença em comparação com a avaliação anterior, sendo considerada desta vez, moderadamente suscetível à doença. Diferentemente da

avaliação anterior, a cultivar Asterix apresentou plantas murchas mais precocemente, mas o desenvolvimento da doença para este genótipo não foi tão acentuado como em 2002 (Figura 4). Este fato pode estar associado a mudanças ambientais ocorridas nos dois períodos, como temperaturas mais amenas registradas no ano de 2003.

A cultivar Achat, a exemplo da avaliação realizada em 2002, também apresentou bom desempenho nesta observação. Os valores de incidência de murcha bacteriana para esta cultivar se aproximaram dos apresentados pelos clones mais resistentes, mas não se assemelhou a ‘MB 03’ e ‘Cruza 148’. Para esta avaliação a cultivar Achat continuou com resistência intermediária (Figura 4), porém, deve-se ressaltar o alto potencial produtivo deste genótipo, característica importante em uma moderna cultivar de batata. O não florescimento de ‘Achat’ em nossas condições inviabiliza o uso deste material em programas de melhoramento convencional que visem resistência à murcha bacteriana (Lopes *et al.*, 1998).

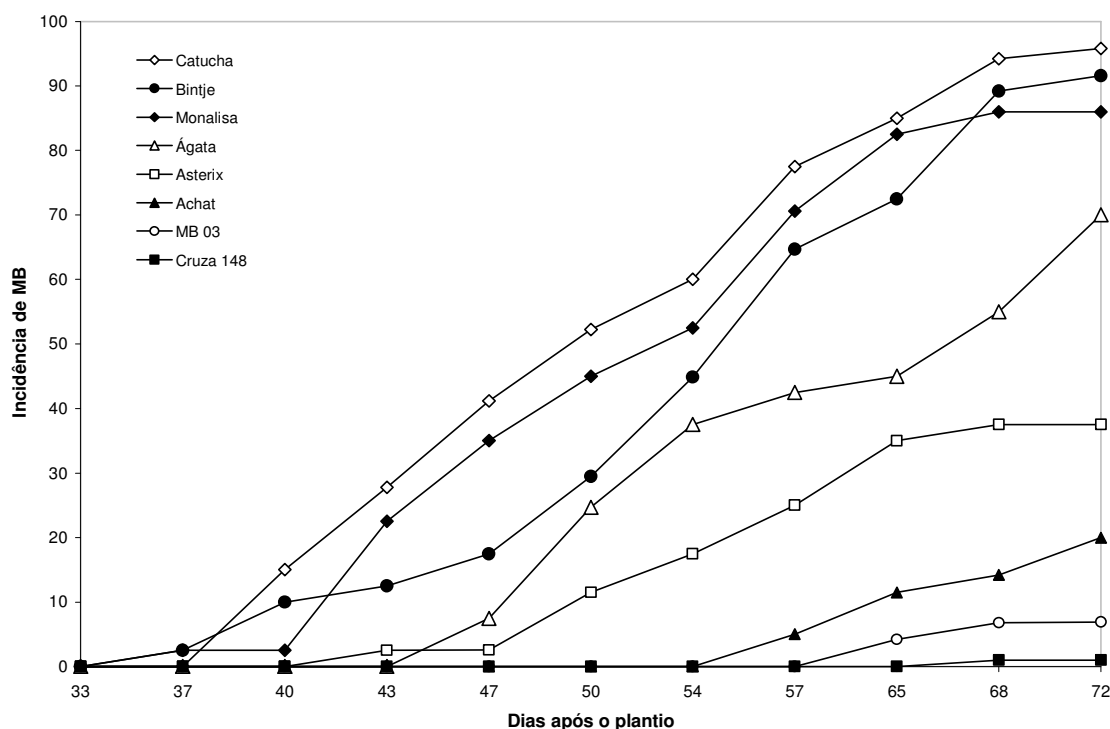


Figura 4. Progresso da murcha bacteriana em cultivares de batata. Avaliação em campo naturalmente infestado com a biovar 1 de *Ralstonia solanacearum*. Brasília-DF, 2003.

Esta avaliação também foi caracterizada por apresentar elevados valores de AACPD para os tratamentos suscetíveis, representados pelas cultivares Ágata, Catucha, Monalisa e Bintje. Embora tenha apresentado diferença significativa em relação às outras cultivares, ‘Asterix’ foi considerada moderadamente suscetível à murcha bacteriana (Figura 5).

O clone MB 03 apresentou baixa incidência de plantas murchas (Figura 4) e baixos valores de AACPD (Figura 5) comprovando sua eficiência em suportar infecções da biovar 1. A resistência de ‘MB 03’ também foi verificada em outras localidades do Brasil para a biovar 2 da bactéria responsável pela murcha da batata (Silveira, 2002). A versatilidade do clone MB 03 é fator primordial para o andamento dos trabalhos de resistência à murcha bacteriana nas condições diversas em que se cultiva a batata, principalmente em áreas onde estirpes de *Ralstonia solanacearum* são endêmicas. A transferência das características de ‘MB 03’ para cultivares de batata está em andamento e o sucesso do programa dependerá da continuidade das avaliações de resistência em condições naturais de infecção.

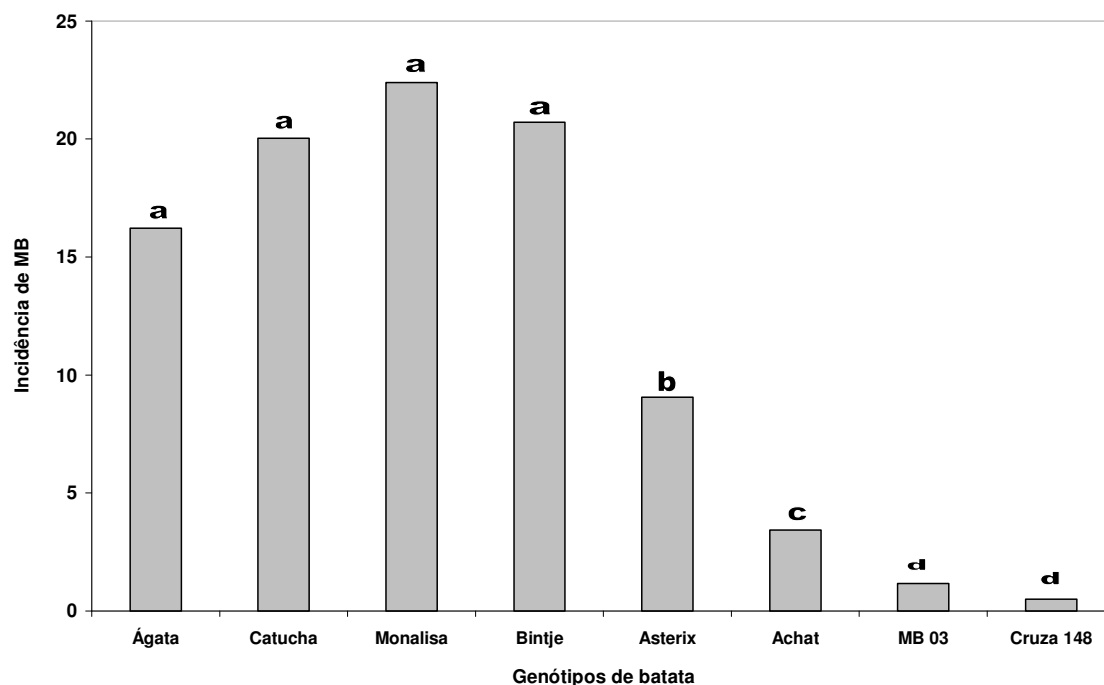


Figura 5. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em clones e cultivares de batata. Avaliação realizada em campo naturalmente infestado com a biovar 1 de *Ralstonia solanacearum*. Brasília-DF, 2003. Mesma letra nas colunas não difere significativamente (Tukey, 5%).

### CAPÍTULO III

## REAÇÃO À MURCHA BACTERIANA EM CLONES DE BATATA DA UNIVERSIDADE DE WISCONSIN E DA COLEÇÃO DO CIP

### 1. INTRODUÇÃO

*Ralstonia solanacearum* é considerada uma das mais importantes bactérias fitopatogênicas em todo o mundo devido aos elevados prejuízos associados a diversas plantas hospedeiras. A doença ocorre em praticamente todas as regiões cultivadas e é responsável por perdas consideráveis em importantes culturas agrícolas, como tomate (*Lycopersicon esculentum*), pimentão (*Capsicum annuum*), fumo (*Nicotiana tabacum*), berinjela (*Solanum melongena*), banana (*Musa* spp.), amendoim (*Arachis hipogaea*), gengibre (*Zingiber officinale*), eucalipto (*Eucalyptus* spp.) e batata (*Solanum tuberosum*). A bactéria também está associada a outras espécies não cultivadas, o que dificulta o seu controle devido à manutenção de sua população em plantas que às vezes são colonizadas e não apresentam sintomas típicos da doença (Hayward, 1994). A doença é também o principal responsável pela condenação de campos de produção de batata-semente, tendo em vista que a legislação nacional de certificação prevê zero de tolerância para murcha bacteriana (Lopes *et al.*, 1990; Oliveira *et al.*, 2003).

A dificuldade encontrada para o manejo da murcha bacteriana em diversas localidades leva alguns pesquisadores a acreditarem que *R. solanacearum* seja um dos patógenos de planta mais destrutivos do mundo, tendo em vista que a doença é relatada em aproximadamente 80 países, causando perdas estimadas em US\$ 950 milhões anualmente (Elphinstone, 2005).

Na cultura da batata (*Solanum tuberosum* L.) a presença da bactéria causadora da murcha é considerada uma das maiores limitações ao seu cultivo em regiões de clima tropical, subtropical e zonas mais quentes de clima temperado em todo o mundo (Hayward, 1991). Em países africanos como Uganda, Kenia e Etiópia, as perdas associadas à doença geralmente ficam entre 50 e 75%, podendo chegar aos 100% (Lemaga *et al.*, 2005). Devido à grande variabilidade das estirpes bacterianas, o

patógeno tem sido classificado em raças de acordo com a espécie hospedeira e em biovars em função da habilidade em digerir ou oxidar diferentes fontes de carbono. Duas estirpes de *R. solanacearum* são capazes de colonizar plantas de batata; as pertencentes ao biovar 1 (raça 1) ocorrem predominantemente em regiões de clima mais quente e possuem uma maior relação de espécies hospedeiras, enquanto as pertencentes ao biovar 2 (raça 3) ocorrem em regiões de clima mais frio, apresentam restrito grupo de plantas hospedeiras e possuem maior capacidade de ocasionar infecções latentes.

Por ser um patógeno adaptado a um grande número de plantas hospedeiras, sob as mais variadas condições de clima e solo, torna-se difícil desenvolver estratégias efetivas de controle, devido, principalmente, à falta de conhecimentos básicos sobre a ecologia e evolução de *R. solanacearum*. O sistema de controle integrado proposto por French (1994) abrange a utilização de cultivares resistentes e modelos apropriados de práticas culturais, que podem alterar de modo adequado o microambiente para o patógeno e, deste modo, influenciar a incidência da doença.

Em relação às estratégias para o controle da doença, a utilização de cultivares resistentes é considerada a mais importante. Entretanto, as avaliações realizadas demonstraram que a resistência genética é instável em virtude da variabilidade das estirpes do patógeno nos diferentes locais e por alterações no ambiente, principalmente temperatura. Tung *et al* (1990) mostraram que em temperaturas mais elevadas, a resistência em batata pode ser superada por estirpes específicas de *R. solanacearum*. Deste modo, justifica-se o estabelecimento de programas de melhoramento em áreas específicas, levando-se em consideração as estirpes prevalentes em cada local.

A maioria das fontes de resistência à murcha bacteriana em batata é originada de clones de *Solanum phureja*, uma espécie diplóide (French *et al.*, 1998), e a maior dificuldade observada em relação à progênie tem sido a estabilidade da resistência, já que esta pode ser quebrada por temperaturas acima de 30 °C (Ciampi *et al.*, 1980).

Nos últimos anos diversos clones resistentes à murcha bacteriana foram selecionados pelo programa de melhoramento genético do Centro Internacional de la Papa (CIP). Contribuíram para o desenvolvimento do programa clones derivados de genótipos de *S. phureja* produzidos na Universidade de Wisconsin, o clone AVRDC-1287 derivado de *S. chacoense* e *S. raphanifolium*, o clone Cruza 148 de origem

desconhecida, resistente à murcha bacteriana e requeima da batata (*Phytophthora infestans*), e a construção de populações diplóides derivadas das espécies *S. chacoense*, *S. sparsipilum*, *S. stenotomum* e *S. goniocalyx* (Priou *et al.*, 2005). A Embrapa Hortaliças em colaboração com o CIP também tem trabalhado no desenvolvimento de genótipos de batata com resistência à doença.

Alguns genótipos resistentes à murcha bacteriana possuem a indesejável característica de abrigarem células do patógeno sem que ocorra manifestação de sintomas, fato conhecido com infecções latentes, e que é bastante comum no padrão internacional de resistência, a cultivar Cruza 148 (Lopes *et al.*, 1998; Priou *et al.*, 2005).

O primeiro programa de melhoramento para resistência à murcha bacteriana foi desenvolvido na Universidade de Wisconsin, por volta da década de 1970. Esses clones eram derivados de *Solanum phureja* e foram utilizados pelo CIP no desenvolvimento de algumas cultivares de batata, sem, portanto, apresentar resistência duradoura em função da quebra da resistência devido à presença de estirpes específicas do patógeno e a não transferência simultânea de genes de adaptação ao ambiente (Tung *et al.*, 1992). A Universidade de Wisconsin tem trabalhado com a espécie *Solanum commersonii* para a transferência de resistência à murcha bacteriana em plantas pertencentes a espécie de batata cultivada, *Solanum tuberosum*. Os clones derivados de *S. commersonii* foram selecionados como resistentes ao biovar 2 (raça 3) de *Ralstonia solanacearum* e enviados para a Embrapa Hortaliças para teste com a biovar 1 da bactéria.

O CIP mantém uma coleção de genótipos de batata, livres de patógenos (PTL), de diversas localidades do mundo, cada qual com características específicas. Dentre elas, os genótipos que indicavam resistência à *Ralstonia solanacearum*, foram gentilmente fornecidos à Embrapa Hortaliças para uso no programa de resistência à murcha bacteriana.

O objetivo deste trabalho foi avaliar os clones da PTL do CIP e da Universidade de Wisconsin para resistência à raça 1, biovar 1 de *R. solanacearum*. Em paralelo, um kit sorológico desenvolvido no CIP foi avaliado para identificar infecção latente nos tubérculos assintomáticos colhidos.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Local da avaliação e delineamento utilizado

Os experimentos foram conduzidos na Embrapa Hortaliças, localizada no núcleo rural da Ponte Alta, Brasília-DF, nos anos de 2002 e 2003, em uma área naturalmente infestada com a biovar 1 de *R. solanacearum*. Nesses experimentos foi avaliada a resistência de diversas cultivares e clones de batata, entre eles, clones desenvolvidos pela Universidade de Wisconsin, cultivares e clones da PTL do CIP e os clones desenvolvidos pelo programa de melhoramento genético da Embrapa Hortaliças.

### 2.2. Experimento 1: Avaliação da resistência à murcha bacteriana em clones de batata derivados de *Solanum commersonii*

Este ensaio teve o objetivo de avaliar a resistência à murcha bacteriana em quatro clones de batata, provenientes da Universidade de Wisconsin, Madison, EUA.

A avaliação se deu entre julho e outubro de 2002. Foi utilizado um delineamento em blocos casualizados com oito tratamentos (genótipos) e cinco repetições. Para cada repetição foram avaliadas oito plantas. Foram avaliados os clones UWL 24-1, UWL 24-2, UWL 23-4 e UWL 26-4, obtidos do cruzamento de HA06-4 e A89804-7. O clone HA06 foi resultante do cruzamento entre LZ3.2 e uma linha haplóide de *S. tuberosum*. LZ3.2 é um acesso de *S. commersonii* selecionado como resistente à raça 3 de *Ralstonia solanacearum* em Wisconsin. ‘Cruza 148’ e ‘MB 03’ foram utilizados como padrões de resistência, ‘Achat’ como padrão comercial de resistência e a cultivar Monalisa, como padrão suscetível.

Durante a condução do ensaio experimental, onze avaliações sobre a incidência de plantas com murcha bacteriana foram realizadas, com início em 26 de agosto de 2002 e término em 17 de setembro de 2002. A partir dos valores da incidência de murcha bacteriana foi calculada a AACPD que representa o nível de reação médio entre todas as avaliações feitas, segundo metodologia proposta por Shaner & Finney (1977). A partir dos valores de incidência foram construídas as curvas de progresso da doença e obtidos os valores da Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), variáveis que foram utilizadas no teste estatístico para a comparação das médias. As

plantas de batata que apresentaram sintomas da doença foram levadas ao laboratório de fitopatologia da Embrapa Hortaliças para verificação da presença de *R. solanacearum*.

A análise para verificação da normalidade dos dados relativos à AACPD e incidência de murcha bacteriana indicou que as observações possuíam distribuição normal, permitindo que os dados fossem submetidos à análise de variância.

Posteriormente à avaliação de resistência destes genótipos de batata, procedeu-se a colheita do experimento para se relacionar a influência da murcha bacteriana na produção de plantas de batata. Os valores de produção são referentes à média das oito plantas (peso total dos tubérculos) de cada repetição (parcela). Para esta variável avaliada se utilizou o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade na comparação das médias.

### **2.3. Experimento 2: Reação de genótipos da PTL do CIP à murcha bacteriana**

O CIP mantém uma coleção de genótipos resistentes a doenças (*Pathogen-tested List*, PTL) que é fornecida a colaboradores. Parte dessa coleção, ou seja, aquelas com indicativo de resistência à murcha bacteriana em pelo menos um dos parentais, foi recebida via cultura de tecidos em 1999. Os genótipos foram então multiplicados *in vitro* e os mini-tubérculos gerados multiplicados duas vezes em telado, em vasos de 3 litros, para a obtenção de número suficiente de tubérculos que permitissem avaliação em campo. Como boa parte desses genótipos não produziu quantidade suficiente de tubérculos, para ensaio em campo, procedeu-se a uma nova multiplicação em 2002. Os genótipos que não forneceram quantidade de tubérculos para avaliação em 2002 foram novamente multiplicados em telado, para permitir uma avaliação em 2003. Para a avaliação dos genótipos da PTL, portanto, foram montados dois ensaios em anos diferentes. Os genótipos que apresentaram melhores resultados em 2002 foram reavaliados em 2003.

Cultivares e clones multiplicados simultaneamente aos clones da PTL foram avaliados e serviram como testemunhas resistentes ('Cruza 148' e 'MB 03') e suscetíveis ('Monalisa' e 'Catucha'). Clones do programa de resistência à murcha bacteriana da Embrapa Hortaliças também foram avaliados nestes ensaios.



### **2.3.1. Ensaio A: Avaliação em 2002**

No primeiro experimento, instalado em 24 de julho de 2002, foram avaliados 17 genótipos, sendo seis da PTL (Tabela 1). Quarenta tubérculos de cada material, livres do patógeno, foram plantados, utilizando-se oito plantas por parcela. O espaçamento foi de 0,8 m entre filas (parcelas) e 0,3 entre plantas. Os tubérculos utilizados para o plantio foram selecionados por tamanho e brotação, para que houvesse a maior uniformidade possível entre os tratamentos. O delineamento experimental foi o de blocos casualizados com cinco repetições.

### **2.3.2. Ensaio B: Avaliação em 2003**

Para esta avaliação instalou-se o ensaio experimental em 18 de agosto de 2003. Desta vez 29 genótipos, 21 da PTL (Tabela 2) foram avaliados seguindo a mesma metodologia descrita no ensaio anterior. A área experimental também foi a mesma utilizada para a avaliação relatada acima.

Para a manutenção do inóculo e de uniformidade de infestação no local, foram realizados plantios sucessivos de batata.

## **2.4. Progresso da murcha bacteriana**

O número de plantas com sintomas de murcha bacteriana para cada avaliação foi registrado a partir da primeira ocorrência, obtendo-se desta forma a incidência de plantas murchas para cada período observado. A partir dos valores de incidência de murcha bacteriana foram construídas as curvas de progresso e calculada a Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) para cada cultivar ou clone, segundo metodologia proposta por Shaner e Finney (1977). A AACPD expressa a quantidade de doença em função do tempo e tem sido utilizada em diversos programas de melhoramento no mundo por ser uma ferramenta eficiente na comparação de resistência entre genótipos a uma determinada doença (Jeger, 2004; Quezado-Soares *et al.*, 1997). A verificação da distribuição normal e o agrupamento das médias foram realizadas para os dois ensaios experimentais utilizando o programa SAS.

As avaliações foram feitas a cada três dias a partir do início do aparecimento dos sintomas, de modo a acompanhar o progresso da doença ao longo do tempo. Foram

realizadas onze avaliações da incidência da doença para cada experimento, nos dois anos de observação, e então, construídas as curvas de progresso para cada genótipo. Os valores referentes à incidência e AACPD foram utilizados para a comparação das médias pelo teste de Duncan a 5% de significância.

Tabela 1. Clones de batata provenientes da PTL do CIP e cultivares utilizadas na primeira avaliação de resistência à murcha bacteriana em condições naturais de infecção. Brasília-DF, 2002.

<b>GENÓTIPOS</b>	<b>GENEALOGIA</b>	<b>PROCEDÊNCIA</b>
Mabondo	Murca (Uganda II) x 378676.6	CIP/Peru
24 AM	Desconhecida-	CIP/Peru
Panda	Desconhecida	CIP/Peru
BW 2	BR 63.65 x Atlantic	CIP/Peru
BW 6	377852.1 (BR-63.74 x WRF-1923.1) x AVRDC 1287.19	CIP/Peru
Surena	S 13 x 528.170	CIP/Peru
N 2676-01	Desconhecida	CIP/Peru
25 AM	Desconhecida	CIP/Peru
Cruza 148	Desconhecida	CIP/Peru
MB 9811-01	Desconhecida	CNPH/Brasil
MB 9846-01	(BWH-87.289 x XY.9) x BP 88166-5	CNPH/Brasil
MB 9806-01	Desconhecida	CNPH/Brasil
Delta	Desconhecida	Holanda
Aracy	Desconhecida	Brasil
Catucha	2CRI-1149-1-78 x C-999-263-70	Brasil
Bintje	Munstersen x Fransen	Holanda
Granola	Desconhecida	Holanda

Tabela 2. Cultivares e clones de batata (*Solanum tuberosum*) avaliados quanto a resistência à murcha bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) em condições naturais de infecção. Brasília-DF, 2003.

GENÓTIPOS	GENEALOGIA	PROCEDÊNCIA
G4	73C-8 x AM 71.1280	CIP/Peru
BW 4	377835.9 (BR-63.65 x Atlantic) x CGN-69-1	CIP/Peru
BW 6	377852.1 (BR-63.74 x WRF-1923.1) x AVRDC 1287.19	CIP/Peru
BW 7	377852.1 (BR 63.74 x WRF 1923.1) x AVRDC 1287.19	CIP/Peru
BW 8	377852.1 (BR 63.74 x WRF 1923.1) x AVRDC 1287.19	CIP/Peru
BW 10	BR 63.74 x DTO 28	CIP/Peru
BW 12	BR 63.74 x WRF 1923.1	CIP/Peru
Kinga	BR 63.74 x WRF 1923.1	CIP/Peru
TS 2	TRB.Bulk.Population & ASC 77.045 x ?	CIP/Peru
TS 4	377887.17 (N 568.7 x R 704.1) x 378017.2 = LT 7	CIP/Peru
FBA 1	377835.11 (BR 63.65 x Atlantic) x Bulk BW	CIP/Peru
FBA 4	A4-17 x 378017.2 = LT 7 (ASC 77.055 x ?)	CIP/Peru
FBA 6	BW 2TD/15 x 378676.6 (LM 1647 x Yur Bulk)	CIP/Peru
FBA 10	LT 7 x MI 49.10	CIP/Peru
27/15	LT 18.5 x Bulk Pseudomonas	CIP/Peru
N Gunda	378164.701 (750815 x Cebeco 32) x Mex Bulk	CIP/Peru
Gikungo	382134.26 (378493.929 x Mex Bulk) x I 1039	CIP/Peru
Ica sirena	(US W29 x 1386) x Katahdin	CIP/Peru
BW III	377835.2 (BR 63.75 x Atlantic) x CGN 69-1	CIP/Peru
P 153	377847.4 (BR 63.74 x Anita) x CGN 69-1	CIP/Peru
P 93	377835.12 (BR 63.65 x Atlantic) x CGN 69-1	CIP/Peru
Cruza 148	Desconhecida	CIP/Peru
MB 384515-01	7XY.1 x Katahdin	CNPH/Brasil
MB 9846-01	(BWH-87.289 x XY.9) x BP 88166-5	CNPH/Brasil
Achat	Fina x Rheinhort	Alemanha
Ágata	Böhm 52/72 x Sirco	Holanda
Monalisa	Bierma A1-287 x Colmo	Holanda
Baronesa	Loman OP	Brasil
Asterix	Cardinal x SVPVe 709	Holanda
Bintje	Munstersen x Fransen	Holanda

## 2.5. Verificação de infecções latentes em tubérculos de plantas sem sintomas

Para a identificação de possíveis infecções latentes foram utilizadas duas técnicas, o plaqueamento em meio de cultura Kelman (Kelman, 1954) e o uso de um kit sorológico desenvolvido pelo Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Peru, que utiliza a técnica da membrana de nitrocelulose, também conhecido como NCM-ELISA (nitrocellulose membrane-ELISA) (Priou *et al.*, 1999).

Foram colhidos tubérculos das cultivares Monalisa, Ágata, Achat, Asterix e dos clones 'Cruza 148', 'MB 03' e 'BW 8' que não apresentaram sintomas de murcha bacteriana em ensaios realizados no ano de 2003. A mesma amostra utilizada para o teste NCM-ELISA foi utilizada no plaqueamento em meio Kelman.

Os tubérculos de plantas sem sintomas foram colhidos separadamente e conduzidos ao Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Hortaliças para a realização dos testes diagnósticos. Como controle negativo, tubérculos livres do patógeno foram utilizados (batata pré-básica). Os tubérculos de cada cultivar ou clone colhidos do campo infestado com *R. solanacearum* foram então desinfestados com o auxílio de NaOCl 1% e água destilada e esterilizada. Os tubérculos selecionados para a avaliação foram seccionados transversalmente com auxílio de um estilete esterilizado. Fragmentos do xilema foram então misturados, formando-se uma amostra composta para cada material (genótipo) e macerados com o auxílio de um tubo de ensaio de paredes grossas, em presença de 3 ml do tampão de extração. Após 25 minutos de repouso para decantação, 20 µl do sobrenadante foram pipetados no centro do quadrado marcado na membrana de nitrocelulose. Após secarem, as membranas foram imersas em 30 ml do tampão de bloqueamento, incluindo tiras de membrana contendo o controle positivo da reação (isolado RS 221/Embrapa Hortaliças). A seguir, procedeu-se a execução das demais etapas do teste, conforme protocolo fornecido pelo kit (Priou *et al.*, 1999). Foram utilizadas amostras com 0, 24 e 48 horas de crescimento, submetidas a 30 °C com agitação constante (170 rpm). A interpretação dos resultados foi efetuada visualmente, considerando-se positivas as amostras que resultaram no aparecimento de manchas de coloração púrpura na membrana. A verificação de infecções latentes foi realizada somente para o experimento de 2003 (segunda avaliação).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Experimento 1: Avaliação da resistência à murcha bacteriana em clones de batata derivados de *Solanum commersonii*

Os testes bioquímicos realizados constataram a presença da biovar 1, confirmando assim, o histórico bioquímico dos isolados coletados naquela localidade. A presença de plantas murchas foi bastante uniforme nas diferentes repetições do ensaio experimental. A uniformidade natural de inóculo no local da experimentação contribuiu para a boa representatividade de doença, minimizando a possibilidade de escape nas plantas assintomáticas. A manutenção da quantidade de inóculo no local foi promovida pelos sucessivos plantios de batata.

A primeira avaliação de plantas de batata com sintomas de murcha bacteriana ocorreu 33 dias após o plantio (DAP) do experimento. Na avaliação seguinte, 35 DAP, a cultivar Monalisa, principal cultivar plantada no Brasil, apresentava aproximadamente 17% de plantas murchas, mostrando dessa forma, a elevada agressividade do isolado local e a alta suscetibilidade desta cultivar (Figura 1). Ao final do período de observação, ‘Monalisa’ apresentou incidência de murcha bacteriana superior a 90%. Os valores de AACPD também mostraram que esta cultivar comportou-se como o genótipo mais suscetível, independente do período observado. Em avaliações anteriores na Embrapa Hortaliças esta cultivar também se mostrou altamente suscetível à biovar 1 da bactéria causadora da murcha. Em trabalho recente, também em condições naturais de infecção, ‘Monalisa’ se comportou como extremamente suscetível à raça 3 (biovar 2) de *R. solanacearum* no Sul do Brasil (Silveira, 2002).

Os clones provenientes da Universidade de Wisconsin UWL 24.2, UWL 23.4 e UWL 26.4, selecionados como resistentes à raça 3 (biovar 2) de *Ralstonia solanacearum* nos EUA, apresentaram os primeiros sintomas de murcha bacteriana na mesma fase que o padrão suscetível (Monalisa), porém, com uma menor porcentagem de plantas murchas, entre 5 e 7,5%. Para estes clones, a evolução da doença foi bastante rápida e significativa, sendo que ao final do período observado estes materiais

comportaram-se como altamente suscetíveis a exemplo do padrão de suscetibilidade (Figura 1).

A elevada incidência de plantas murchas verificada ao final do ciclo no ensaio experimental revela a complexidade do manejo da murcha bacteriana, doença que possui alto poder de destruição, em relativamente curto período de tempo. A cultivar Monalisa e o clone UWL 26.4 registraram incidência de murcha bacteriana acima de 90% ao final do período de avaliação.

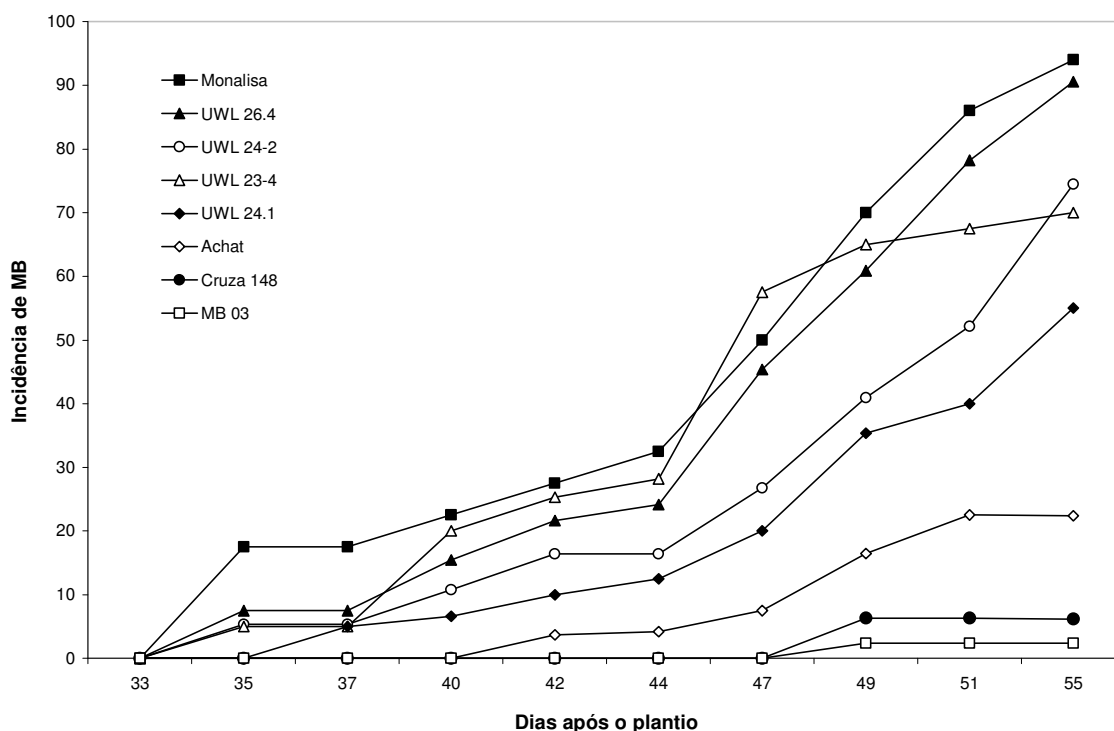


Figura 1. Incidência e progresso da murcha bacteriana em genótipos de batata na Embrapa Hortaliças. Brasília-DF, 2002.

Os valores de área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) também mostraram a elevada suscetibilidade que os clones derivados de *S. commersonii* apresentam em relação à biovar 1 de *R. solanacearum* nas condições ambientais testadas. Maiores valores de AACPD refletem menor resistência do material avaliado (Figura 2)

Os critérios incidência de murcha bacteriana e AACPD foram concordantes para se analisar o progresso da murchadeira em batata (Figuras 1 e 2). Porém, o uso dos

valores referentes à AACPD parece ser mais consistente para a verificação da resistência, por refletir a integração dos valores referentes à quantidade de doença em cada parcela em função do período da observação.

Uma pequena resistência inicial foi verificada no clone UWL 24.1. Este clone não apresentou nenhuma planta murcha 35 dias após o plantio, alcançando somente 10% de plantas doentes na quinta avaliação (42 dias após o plantio). A resistência inicial do clone UWL 24.1 manteve-se pouco estável no decorrer do período observado, mas os valores de AACPD registrados por este clone, foram suficientes para enquadrá-la como genótipo moderadamente suscetível, tendo em vista, que este tratamento se diferenciou significativamente dos demais clones de Wisconsin e do padrão suscetível 'Monalisa'. Embora os clones derivados de *Solanum commersonii* não tenham mostrado boa resistência à biovar 1 de *R. solanacearum*, sua participação em programas de melhoramento genético não deve ser descartada, uma vez que estes materiais apresentaram boa performance frente a estirpes da biovar 2, em avaliações realizadas na Universidade de Wisconsin e poderão ser utilizados para ampliar a base genética da resistência à murcha bacteriana. Genótipos de batata que apresentem resistência à biovar 2 de *R. solanacearum* devem ser testados no Sul do Brasil, local onde essa estirpe da bactéria é considerada endêmica (Silveira *et al.*, 2002; Maciel *et al.*, 2001).

Resistência específica a uma determinada variante do patógeno é relatada em diversos patossistemas. Para *R. solanacearum* a resistência genética tem demonstrado instabilidade em virtude da variabilidade das estirpes do patógeno nos diferentes locais e por alterações do ambiente, principalmente de temperatura nas diferentes regiões climáticas. Em regiões de temperaturas mais elevadas, a resistência pode ser superada por estirpes específicas do patógeno (Tung, 1990). Dessa forma, justifica-se o estabelecimento de programas de melhoramento em áreas específicas, levando-se em consideração as estirpes prevalentes em cada local (Lopes & Giordano, 1983). Embora os clones não tenham apresentado resistência efetiva à biovar 1, a resistência genética para as duas biovars que causam murcha em batata constitui importante ferramenta no desenvolvimento de estratégias para o controle da murcha bacteriana, uma vez que

resistência específica a determinadas variantes do patógeno pode contribuir para a disseminação da bactéria (Quezado-Soares *et al.*, 1997).

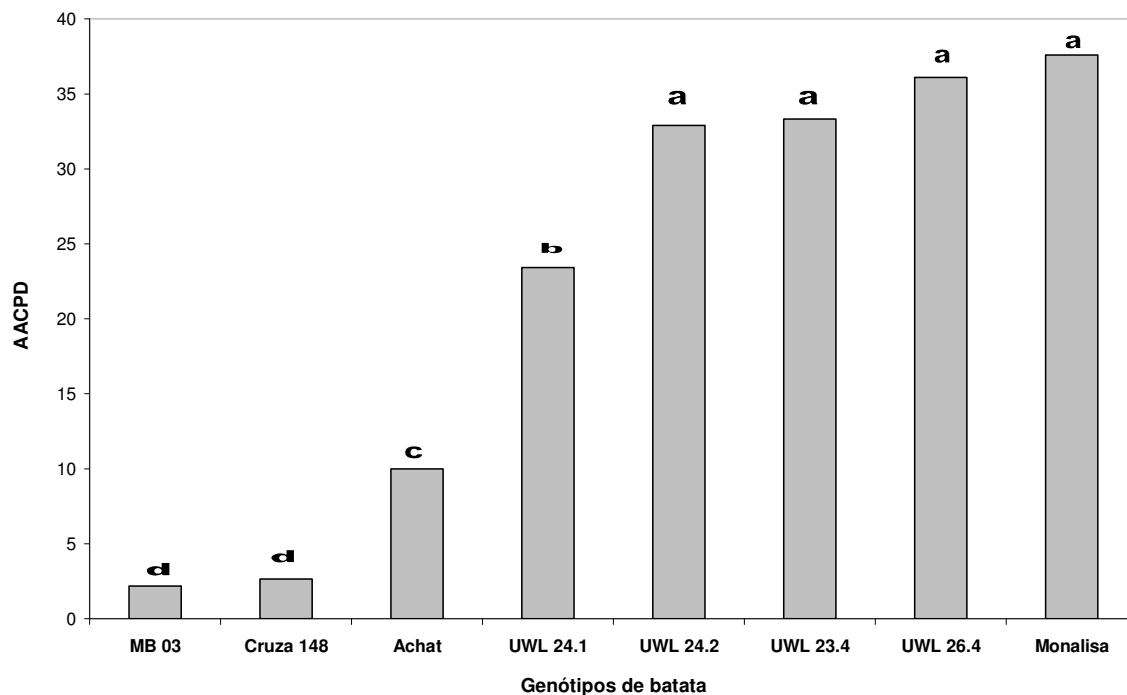


Figura 2. Comportamento de genótipos de batata avaliados pela Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) em campo naturalmente infestado com a biovar 1 de *Ralstonia solanacearum*. Brasília-DF, 2002.

Ao se analisar o progresso da murcha bacteriana para os diferentes tratamentos, verifica-se que a cultivar Achat mostrou boa resistência durante quase todo o período de avaliação, tendo um maior desenvolvimento de doença na fase final (Figura 1). Mesmo assim, a cultivar Achat foi considerada como moderadamente resistente, apresentando diferença significativa em relação aos materiais mais suscetíveis. Apesar da boa resistência mostrada por 'Achat' este genótipo não tem sido utilizado em programas de melhoramento devido ao seu não florescimento, o que impossibilita os trabalhos de melhoramento tradicional. A cultivar Achat deveria ser utilizada em locais sujeitos à ocorrência de murcha bacteriana uma vez que seu cultivo pode ser uma ferramenta complementar ao manejo integrado da doença.

Os clones 'Cruza 148' e 'MB 03' foram os mais resistentes independente do período avaliado, diferindo significativamente da cultivar de resistência intermediária



Achat, dos clones derivados de *S. commersonii* e do padrão suscetível (Monalisa). Os valores de AACPD apresentados confirmaram a superioridade do padrão internacional de resistência (clone Cruza 148) e do clone selecionado na Embrapa Hortaliças (MB 03) em relação aos outros tratamentos testados (Figura 2). A curva de progresso da doença revelou que os clones resistentes apresentaram esta característica em todas as fases da avaliação, mostrando que estes materiais apresentam ótimas condições para serem utilizados em programas de melhoramento à murcha bacteriana. A resistência nestes genótipos tem se mantido estável, uma vez que, em ensaios experimentais instalados em outras regiões geográficas, a resistência à murcha bacteriana tem se mantido independentemente da estirpe da bactéria encontrada.

Após as avaliações de resistência dos materiais testados, procedeu-se a colheita dos tubérculos produzidos pelos diferentes genótipos. As avaliações da produção mostraram a importância da manifestação inicial dos sintomas na redução de produtividade das plantas (Figura 3). Os genótipos que apresentaram maior resistência também foram os que mostraram maior produção total de tubérculos. Isso é devido ao fato de *R. solanacearum* ao colonizar os tecidos da planta impedir o transporte de água e nutrientes, elementos essenciais para a sobrevivência e produção da planta. Infecções precoces de murcha bacteriana resultam em morte da planta de batata antes mesmo que esta tenha começado a formar tubérculos. Em infecções tão severas como ocorridas no ensaio experimental, os tubérculos produzidos são afetados tanto quantitativamente, como em qualidade, o que praticamente impossibilita o consumo de batata em função da má aparência e podridão da mesma.

‘Cruza 148’, ‘MB 03’ e a cultivar Achat foram os genótipos que apresentaram maior produção de tubérculos, diferindo significativamente dos demais tratamentos. Embora não tenha havido diferença significativa entre ‘Cruza 148’ e ‘MB 03’ em relação à AACPD (Figura 2), é importante ressaltar, que o clone da Embrapa Hortaliças apresentou menor produção que ‘Cruza 148’ (Figura 3). Este fato pode ser explicado devido à baixa produção apresentada pelo genótipo ‘MB 03’, fator este que tem dificultado sua multiplicação na Embrapa. Fato semelhante ocorreu em relação a cultivar Achat, que foi significativamente menos resistentes que os clones acima mencionados e apresentou produção similar. ‘Achat’ é uma cultivar precoce que

apresenta alto potencial produtivo e compensou a menor resistência com a maior produção de tubérculos.

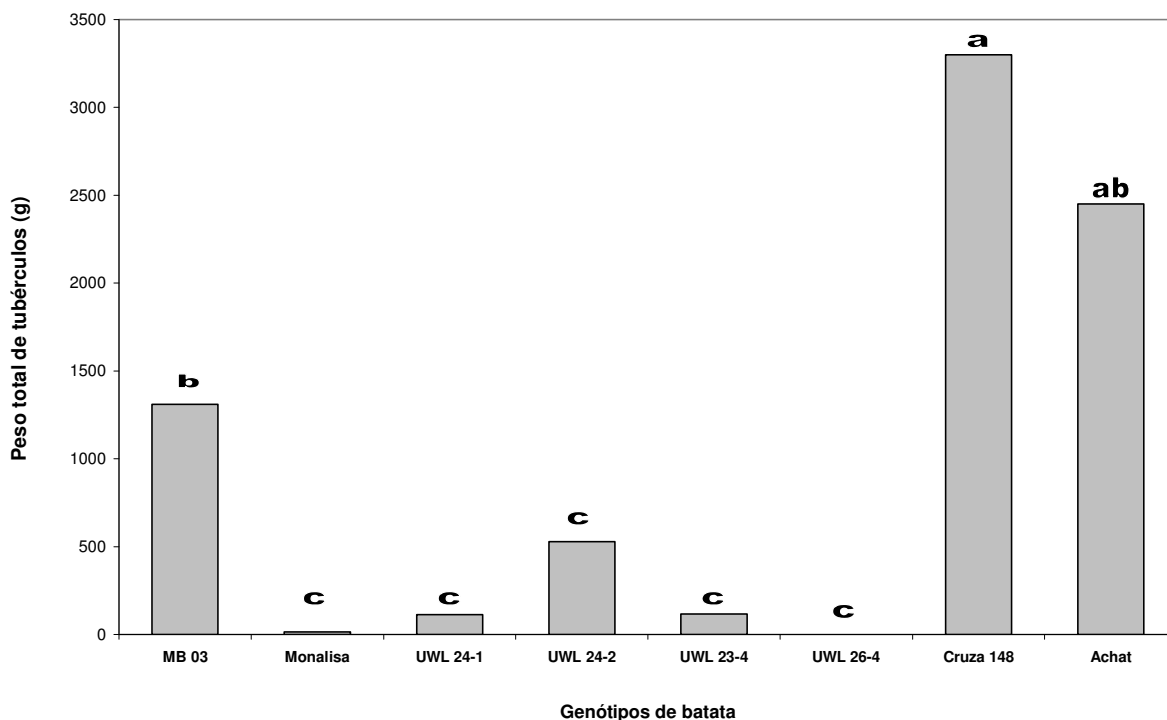


Figura 3. Produção total de tubérculos de batata (*Solanum tuberosum*) em campo naturalmente infestado com raça 1 de *Ralstonia solanacearum*. Valores médios de cinco repetições de oito plantas. Brasília-DF, 2002.

A cultivar Monalisa e parte dos clones da Universidade de Wisconsin apresentaram valores de produção muito abaixo dos demais tratamentos, apresentando diferença significativa tanto para resistência como para produção de tubérculos. A cultivar Monalisa e o clone UWL 26.4 apresentaram produção muito perto de zero, indicando que infecções precoces associadas a genótipos muito suscetíveis inviabilizam a produção de batata em solos infestados com *R. solanacearum* (Figura 3).

### 3.2. Experimento 2: Reação de genótipos da PTL do CIP à murcha bacteriana

Onze avaliações para cada um dos períodos foram realizadas sobre a incidência de plantas com murcha bacteriana, com início em 26 de agosto de 2002 e término em 20 de setembro de 2002, para o primeiro período (Ensaio A), e início das observações

em 20 de setembro de 2003 e término em 30 de outubro de 2003 para o segundo período (Ensaio B). O período de observação do segundo ensaio prolongou-se devido à menor incidência de murcha bacteriana no ano de 2003.

De modo análogo ao Experimento 1, plantas de batata com sintomas da doença foram levadas ao laboratório de fitopatologia da Embrapa Hortaliças para verificação da presença de *R. solanacearum*. A presença de plantas murchas foi bastante uniforme nas diferentes repetições do ensaio experimental, para os dois períodos de avaliação. A quantidade natural de inóculo no local da experimentação contribuiu para a boa representatividade de doença, minimizando ao máximo a possibilidade de escape nas plantas assintomáticas.

A análise exploratória para verificação da normalidade dos dados relativos à AACPD e incidência de murcha bacteriana indicou que as observações possuem distribuição normal, permitindo que os dados fossem submetidos à análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

### **3.2.1. Ensaio A: Avaliação em 2002**

Os primeiros sintomas foram observados 35 dias após o plantio (DAP) do experimento. As cultivares Bintje, Aracy, Panda, Catucha e os clones '25 AM', 'MB 9811-01', '24 AM' foram os primeiros genótipos a manifestarem sintomas de murcha bacteriana na primeira avaliação. As cultivares Bintje, Aracy, Panda, Catucha e os clones '25 AM', 'MB 9811-01' e '24 AM' formaram o grupo dos genótipos mais suscetíveis, diferindo significativamente dos outros tratamentos e do padrão de resistência 'Cruza 148'. A evolução da doença para esse grupo de suscetibilidade foi muito rápida, tendo em vista, que 48 dias após o plantio, mais de 50% das plantas dos genótipos 'Bintje', 'Aracy', 'Panda', 'Catucha' e '25 AM' estavam murchas em todas as repetições (Figura 5A).

Os genótipos 'Surena', 'MB 9806-01', 'BW 6', 'N-2676-01' e 'Granola' formaram um grupo intermediário de suscetibilidade, apresentando menor incidência de murcha bacteriana e AACPD, em comparação aos genótipos mais suscetíveis (Figura 5B). Estes materiais apresentaram diferença significativa em relação aos tratamentos mais suscetíveis ( $P < 0,001$ ). Entre estes genótipos intermediários, Surena, o clone MB

9806-01, 'BW 6' e 'N-2676-01' apresentaram os primeiros sintomas da doença entre 10 e 15 dias após os genótipos mais suscetíveis, confirmando que infecções tardias resultam em menores valores de AACPD e, conseqüentemente, maior tolerância à murcha bacteriana. A cultivar Delta embora tenha manifestado sintomas de murcha na mesma época que os genótipos do grupo intermediário, foi considerado altamente suscetível, tendo em vista que a quantidade de doença deste tratamento atingiu valores superiores a 60% de plantas murchas ao final das avaliações. Deste grupo intermediário de suscetibilidade, chama a atenção o desempenho do clone da Embrapa Hortaliças MB 9806-01 (produto do programa de resistência à MB) que se comportou muito bem até 50 dias após o plantio. Porém, após esta data, a velocidade de desenvolvimento da doença foi muito rápida, o que o diferenciou dos tratamentos resistentes (Figura 5B).

Os genótipos de batata mais resistentes foram 'Cruza 148' e 'MB 9846-01', seguidos de 'Mabondo', 'BW 2' e 'Delta'. O clone Cruza 148 (padrão internacional de resistência) e o clone MB 9846-01 (experimental da Embrapa Hortaliças) apresentaram 2,8 e 5,1% de plantas murchas respectivamente. Os genótipos 'Mabondo' (10% de plantas murchas), 'BW 2' (16,5% de plantas murchas) e a cultivar Delta (22% de murcha) embora tenha apresentado incidência de murcha bacteriana um pouco mais elevada que Cruza 148 e MB 9846-01, também foram considerados boas fontes de resistência (Figura 5). Estes tratamentos diferiram significativamente dos genótipos intermediários e dos materiais mais suscetíveis, tanto em análise realizada com os valores da incidência da murcha bacteriana como de AACPD.

O clone MB 9846-01 é um genótipo com grande potencial para futuros cruzamentos que visem à incorporação de resistência à murcha bacteriana. Este material apresenta bom florescimento e aspecto satisfatório de tubérculos, além de ser muito produtivo. A cultivar Mabondo é bastante utilizada em regiões da África devido ao seu alto potencial produtivo, principalmente em países devastados por guerras civis, como Ruanda e República Democrática do Congo (Tanganik *et al.*, 1999). Esta cultivar em função de sua performance em campos infestados com murcha bacteriana associada ao seu bom potencial de florescimento, também poderá ser usada como mais uma fonte de resistência à biovar 1 de *R. solanacearum*.

Para esta avaliação, dos genótipos de batata enviados pelo CIP, somente dois genótipos (a cultivar Mabondo e o clone BW 2) mostraram-se como boas alternativas para controle da murcha bacteriana nas condições testadas. O clone 9846-01 da Embrapa Hortaliças, também apresentou desempenho muito satisfatório. O clone 9846-01 mostrou AACPD muito próxima do padrão de resistência (Cruza 148).

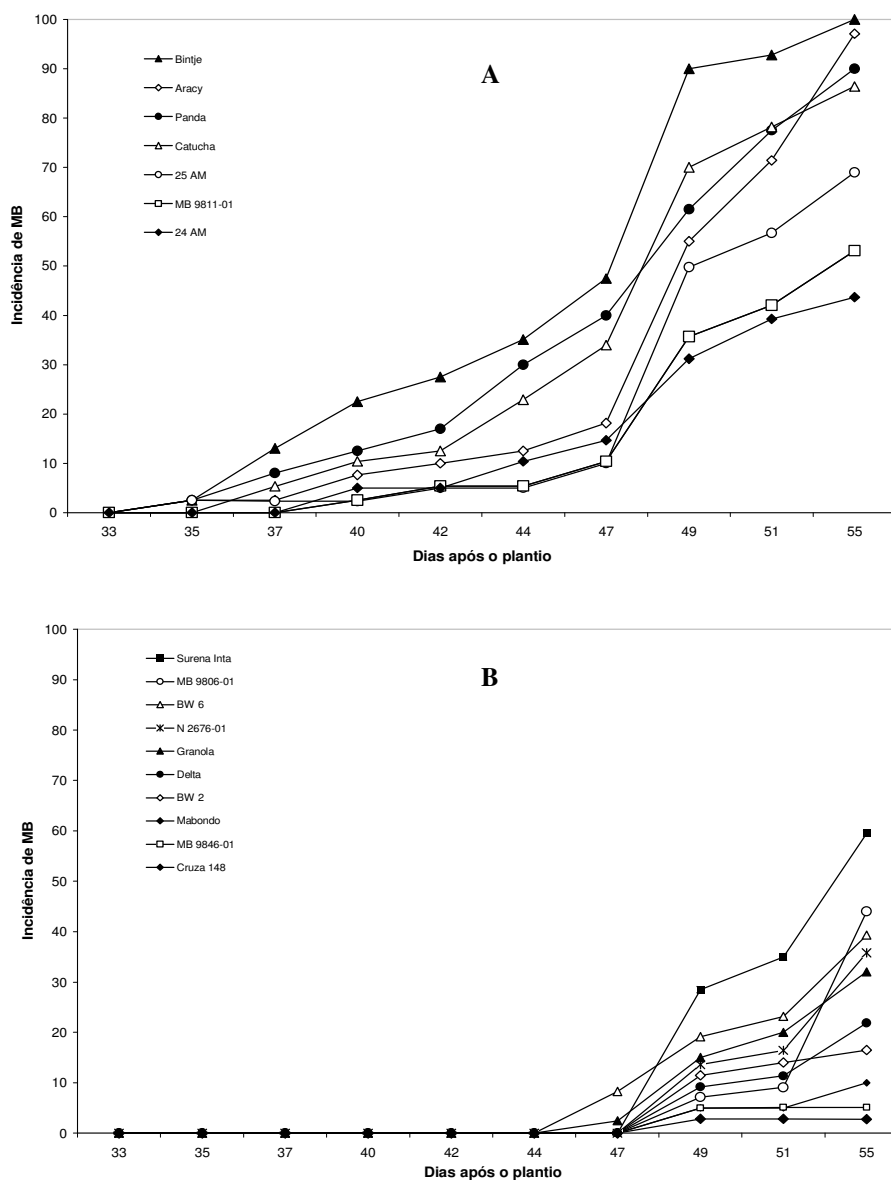


Figura 4. Progresso da murcha bacteriana (MB) em plantas de batata. Avaliação em campo infestado com *Ralstonia solanacearum*. A – Genótipos que manifestaram sintomas de MB antes de 37 dias após o plantio. B – Genótipos que apresentaram os sintomas de MB após 44 dias de cultivo. Brasília-DF, 2002.

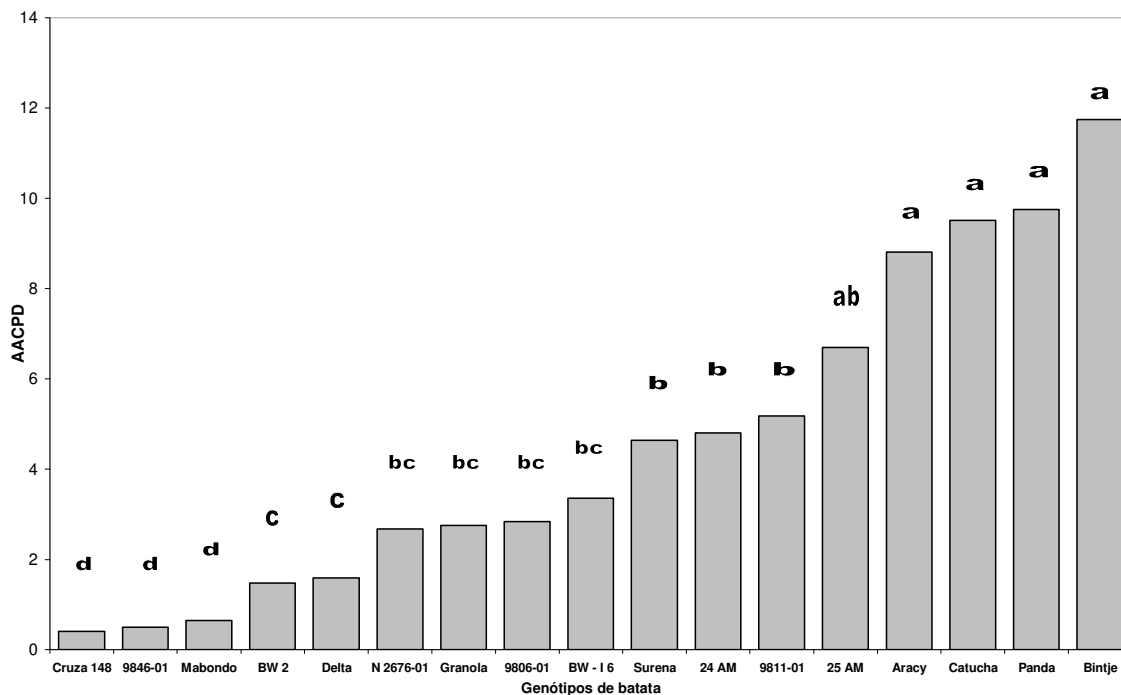


Figura 5. Reação de cultivares e clones de batata avaliados pela área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em campo naturalmente infestado com a biovar 1 de *Ralstonia solanacearum*. Brasília - DF, 2002.

As cultivares 'Bintje', 'Aracy', 'Panda', 'Catucha' e '25AM' apresentaram mais de 60% de plantas doentes (Figura 5A) e foram os tratamentos que apresentaram os maiores valores de AACPD (Figura 6). Outro grupo de suscetibilidade é formado pelos genótipos 'Surena', '24 AM', e 'MB 9806-01'. Estes genótipos apresentaram diferenças significativas em relação ao padrão de resistência 'Cruza 148'. No Sul do Brasil as cultivares Bintje e Catucha foram também extremamente suscetíveis a raça 3 de *R. solanacearum* (Silveira, 2002).

Com a finalização das observações de plantas murchas procedeu-se a colheita dos tubérculos produzidos pelas diferentes cultivares e clones de batata. A baixa produção apresentada pelos genótipos testados mostrou a importância da manifestação inicial dos sintomas na redução da produtividade das plantas de batata (Figura 7). Os genótipos mais resistentes também foram os que apresentaram maiores produções de tubérculos. Infecções precoces levam a planta à morte antes da fase de produção de tubérculos o que explica a baixa ou nenhuma produção alcançada por alguns

tratamentos. Infecções muito severas como as ocorridas na avaliação influenciam na redução da quantidade e qualidade dos tubérculos produzidos.

O clone MB 9846-01 e a cultivar africana Mabondo foram os genótipos mais produtivos entre todos os tratamentos avaliados, formando com 'Cruza 148' o grupo dos mais produtivos, com diferença significativa em relação aos demais tratamentos ( $P < 0,001$ ). Embora bastante produtivo e resistente o clone MB 9846-01 não possui tubérculos com boas características comerciais. Entretanto, em relação ao padrão internacional de resistência (Cruza 148), é bem superior nesta característica. A mesma observação é válida para a cultivar Mabondo. O clone Cruza 148 em observações anteriores realizadas na Embrapa Hortaliças mostrou resultados positivos em relação à resistência (Lopes *et al.*, 1998) e produção de tubérculos, mas de acordo com Tung (1992), não é um bom genitor por transferir suas características indesejáveis à sua progênie.

As cultivares Aracy, Bintje e Catucha tiveram produção zero em função da morte precoce das plantas em todas as repetições do ensaio experimental. Os demais tratamentos, com exceção do clone MB 9806-01, da cultivar Granola e do clone '24AM', apresentaram produções muito baixas em relação aos tratamentos superiores.

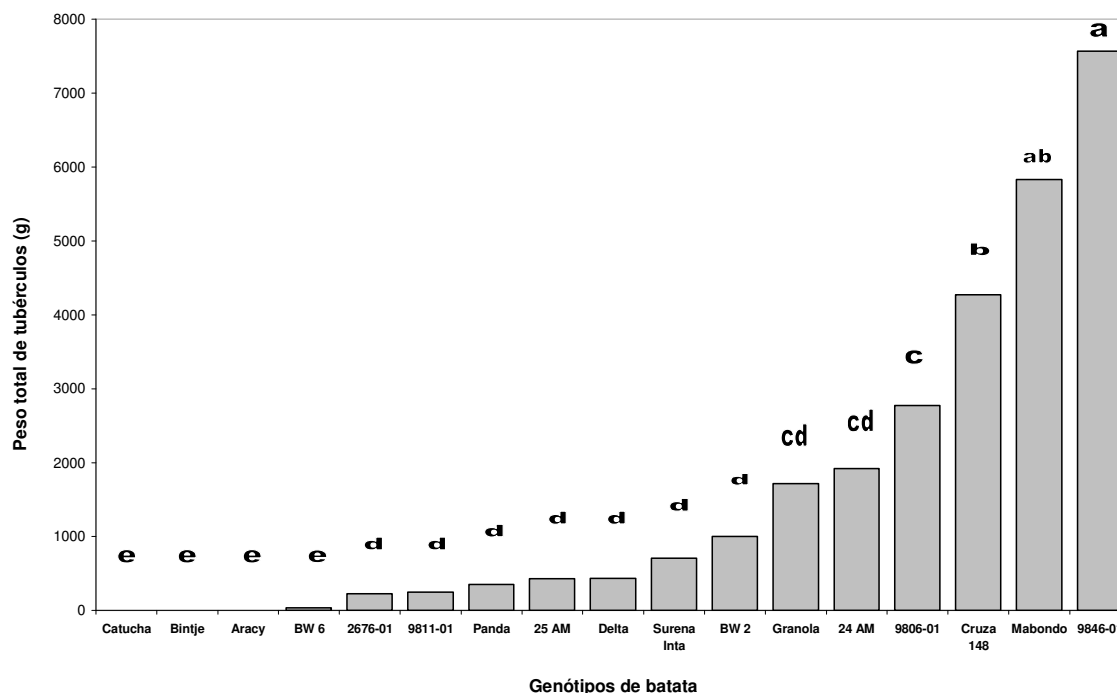


Figura 6. Produção total de tubérculos de batata em campo de murcha bacteriana. Brasília-DF, 2002. Letras diferentes indicam diferenças significativas no peso total de tubérculos (Tukey, 5%).

### 3.2.2. Ensaio B: Avaliação em 2003

Os primeiros sintomas foram observados 37 dias após o plantio. Todos os genótipos, com exceção de ‘Cruza 148’ e do clone ‘BW 8’, apresentaram sintomas da doença na primeira avaliação. A cultivar Bintje mostrou-se altamente suscetível. Alta suscetibilidade foi também verificada em alguns clones da PTL do CIP, como os genótipos ‘G4’, ‘FBA 4’ e ‘TS 4’ (Figura 8A). Neste grupo de suscetibilidade também se enquadraram as cultivares Baronesa, Monalisa e Asterix. Outro grupo de suscetibilidade foi formado pelos genótipos P 93, BW 6, BW 12, FBA 6, BW 4, Kinga, Ágata e N-Gunda, todos com exceção da cultivar Ágata são pertencentes à PTL do CIP, indicando que alguns genótipos da PTL podem não ser boas fontes de resistência à raça 1 de *R. solanacearum*. A maioria dos genótipos procedentes do CIP mostrou-se suscetíveis à murcha bacteriana, com incidência acima de 45% (Figura 8B). Os clones resistentes apresentaram menos de 10% de plantas com sintomas de murcha bacteriana, mostrando sintomas a partir de 55 DAP (Figura 8C).



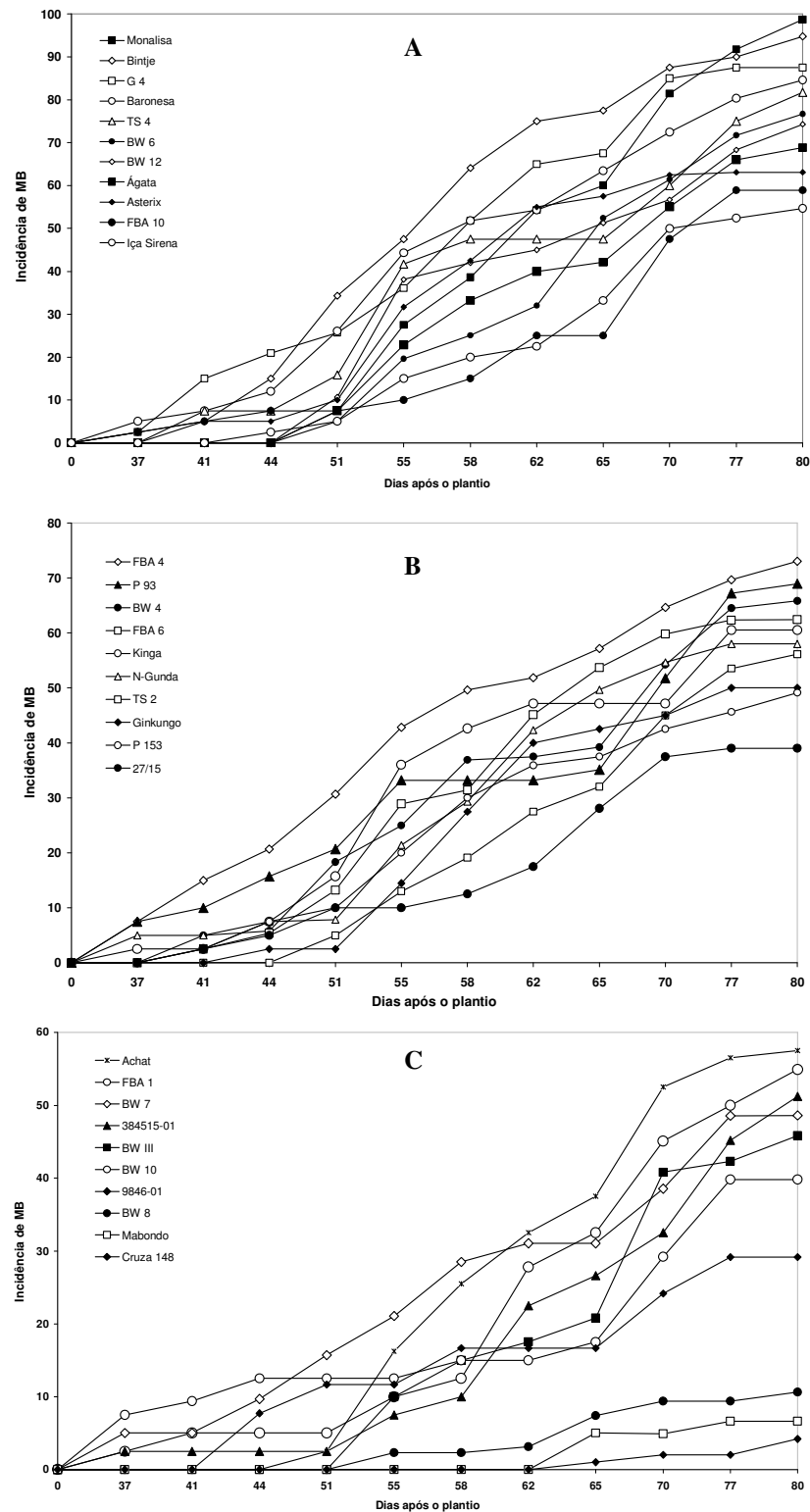


Figura 7. Progresso da murcha bacteriana em genótipos de batata da coleção da PTL do CIP. A e B - Genótipos de maior suscetibilidade à murcha bacteriana em área infestada. C - Genótipos de suscetibilidade moderada e clones resistentes. Brasília-DF, 2003.

O clone BW 8 apresentou as primeiras plantas com sintomas de murcha bacteriana 58 dias após o plantio. Na oitava avaliação (65 dias após o plantio) ocorreram os primeiros sintomas de murcha bacteriana em plantas da cultivar Mabondo e em ‘Cruza 148’. Novamente, verifica-se a importância das infecções iniciais para o maior desenvolvimento da murcha bacteriana. Em todas as avaliações realizadas, os clones considerados resistentes apresentaram os primeiros sintomas da doença entre 10 e 15 dias após os sintomas aparecerem nos materiais mais suscetíveis.

A baixa resistência de boa parte dos clones enviados pelo CIP pode ser explicada pela influência de outros fatores que afetam o bom desempenho da resistência em sistemas poligênicos, como o efeito de temperatura (Tung *et al.*, 1992) e principalmente, a presença de outras variantes do patógeno, no caso a raça 1 de *R. solanacearum*. Clones desenvolvidos na região em que ocorreu a avaliação podem não apresentar o mesmo desempenho de resistência em outras localidades. Silveira (2002), ao avaliar o progresso da murcha bacteriana em cultivares e clones de batata infectadas pela biovar 2 (raça 3) de *R. solanacearum*, verificou que o clone Cruza 148 (padrão internacional de resistência) apresentou em uma das avaliações incidência próximo a 80% de plantas murchas.

O clone Cruza 148, a exemplo das avaliações realizadas no ano anterior, foi o genótipo que apresentou menor AACPD, porém, não houve diferença significativa entre este tratamento e os genótipos ‘MB 9846-01’, ‘BW 8’ e ‘Mabondo’ (Figura 9). A cultivar Mabondo e o clone MB 9846-01 foram testados novamente nessa experimentação em função de seu bom desempenho em relação à murcha bacteriana na avaliação anterior. Novamente, os dois genótipos mostraram boa resistência à biovar 1 de *R. solanacearum*, comprovando seu potencial como genitor no desenvolvimento de cultivares resistentes.

O clone BW 8 mostrou ser uma boa fonte de resistência para os futuros cruzamentos na Embrapa Hortaliças que visam à obtenção de plantas de batata resistentes a murcha bacteriana associada a características agrônomicas desejáveis. O clone BW 8, procedente da *Pathogen Tested List* do CIP, apresenta boas características agrônomicas, como formato comercial (redondo-alongado), película amarela e boa tuberização. Ao contrário da avaliação em genótipos da PTL realizada anteriormente

(Ensaio A, 2002) para esta experimentação não foi observada a produção relativa das plantas de cada tratamento.

A estabilidade da resistência associada à boa produção e qualidade de tubérculos é o objetivo de todo programa de melhoramento de resistência da batata à murcha bacteriana. A resistência à murcha bacteriana em batata é poligênica, sendo necessária uma combinação adequada de genes de resistência e de genes de adaptação ao ambiente para uma expressão efetiva desta característica (Tung, 1992).

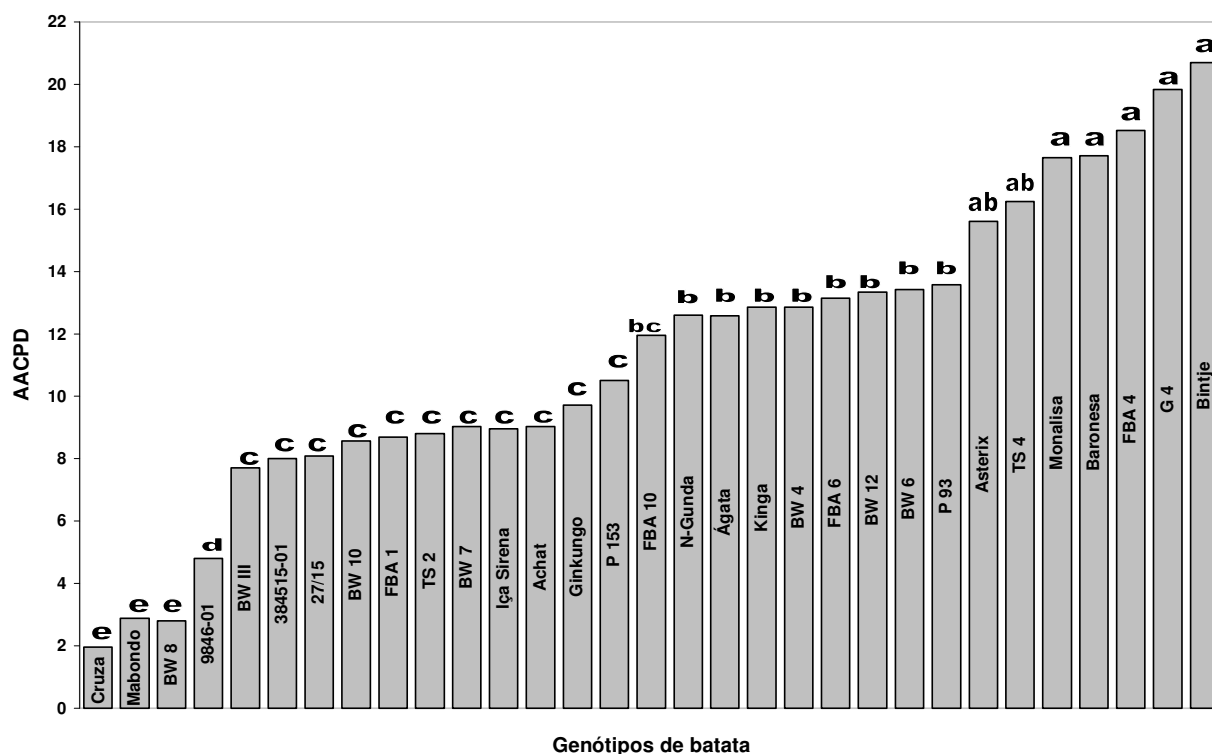


Figura 8. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em genótipos da PTL do CIP. Avaliação em campo de murcha bacteriana. Brasília - DF, 2003. Letras diferentes indicam diferenças significativas (Tukey, 5%).

‘Mabondo’ e ‘BW 6’, genótipos da PTL do CIP, comportaram-se de forma semelhante nas duas avaliações realizadas, mostrando boa estabilidade de resistência à biovar 1 de *R. solanacearum*. A cultivar Mabondo apresentou incidência de murcha bacteriana inferior a 15% nos dois anos de avaliação (Figuras 5 e 8) e também poderá ser utilizada no programa de melhoramento para a transferência de seus genes de resistência.

### 3.3. Verificação de infecções latentes em tubérculos de plantas sem sintomas

O teste de NCM-ELISA resultou em dezoito amostras positivas, o que representa um percentual de 30% de infecções latentes nos tubérculos analisados. Técnicas laboratoriais na identificação de formas latentes da bactéria são essenciais para minimizar os riscos de disseminação do agente causador da murcha em âmbito mundial. O plaqueamento de culturas em meio Kelman apresentou eficiência um pouco maior em relação ao NCM-ELISA (Tabela 3).

Técnicas mais precisas na detecção de *R. solanacearum* são utilizadas em diversos países do mundo, principalmente na Europa. Recentemente, diversos surtos de murcha bacteriana na cultura da batata foram detectados em diferentes países da Comunidade Européia (Elphinstone *et al.*, 1998). O uso de técnicas moleculares como PCR, AFLP, RAPD na identificação de *R. solanacearum* em diversas culturas tem sido utilizada com bastante frequência devido ao seu alto poder de detecção (Martins, 2000, Alvarez *et al.*, 2005). Essas metodologias também são utilizadas na detecção de “formas viáveis e não cultiváveis” (VBNC) da bactéria responsável pela doença (Biosca *et al.*, 2005).

A importância da identificação de formas latentes de *R. solanacearum* em genótipos de batata que apresentam resistência ao patógeno é necessária para evitar a disseminação da bactéria em tubérculos que embora sejam resistentes, são passíveis da colonização do agente da murcha.

Os clones MB 03 e Cruza 148 apesar de serem resistentes podem servir como veículos disseminadores de *R. solanacearum* tendo em vista a identificação de infecção latente em seus tubérculos. Elevadas incidências de infecções latentes foram relatados para o clone Cruza 148 em trabalho realizado no CIP (Priou *et al.*, 2000). Não foram encontradas plantas com infecção latente para o genótipo BW 8, considerado resistente na avaliação de materiais procedentes da PTL do CIP. Novos testes de infecções latentes, utilizando diferentes métodos (ELISA e/ou PCR) devem ser realizados em ‘BW 8’ para se confirmar os resultados apresentados, tendo em vista a possibilidade de falsos negativos ou escape.

Tabela 3. Número de amostras positivas para *Ralstonia solanacearum* avaliadas pelos testes NCM-ELISA e meio Kelman, obtidas de tubérculos de plantas sem sintomas de murcha bacteriana, de cultivares e clones plantados em área naturalmente infestada com o patógeno. Brasília-DF, 2003.

<b>Genótipo</b>	<b>Número de amostras</b>	<b>NCM-ELISA</b>	<b>Meio Kelman</b>
Monalisa	2	0	0
Cruza 148	18	10	12
MB 03	12	5	6
Achat	8	2	3
Asterix	4	0	0
BW 8	10	0	0
Ágata	6	1	0
<b>Total</b>	<b>60</b>	<b>18</b>	<b>21</b>

## CAPÍTULO IV

### DESENVOLVIMENTO DE CLONES DE BATATA PARA RESISTÊNCIA À MURCHA BACTERIANA NA EMBRAPA HORTALIÇAS

#### 1. INTRODUÇÃO

A murcha bacteriana é considerada atualmente como uma das doenças mais importantes da cultura da batata (*Solanum tuberosum*), devido à complexidade do seu controle e aos elevados prejuízos que pode causar. A doença é causada pela bactéria *Ralstonia solanacearum* e está amplamente distribuída no mundo, ocorrendo principalmente em regiões de clima tropical e subtropical. *Ralstonia solanacearum* teve recentemente aumentada a sua importância no continente europeu depois de surtos em áreas de produção de batata na Suécia, Bélgica, França, Itália, Holanda, Portugal e Inglaterra (Elphinstone *et al.*, 1998). A ocorrência da murcha bacteriana em plantas de batata na Europa é devida principalmente ao processo de seleção e proliferação de uma variante do patógeno adaptada às condições de clima frio (Timms-Wilson *et al.*, 2001).

Ao contrário de outras importantes doenças da batata a murcha bacteriana possui controle muito complexo. Como efeito de comparação, a requeima causada por *Phytophthora infestans*, outra doença bastante destrutiva, pode ser controlada com o uso de produtos químicos e por meio de cultivares de resistência monogênica. Para a murcha bacteriana o controle químico não é eficaz e os estudos sobre a herança da resistência demonstram que para esta doença a herança é poligênica.

O controle da murcha bacteriana só tem sido possível quando várias medidas complementares são observadas, dentro da estratégia do manejo integrado. Se a cultura se destina à produção de batata consumo, é possível conviver com a doença, desde que ela seja bem monitorada e não atinja níveis de dano econômico. Entretanto, no caso de batata-semente, esta convivência não é aceitável, visto que a legislação nacional de certificação de batata-semente prevê tolerância 0 (zero) para esta doença.

Para French (1994), dentre as estratégias para o controle da doença, a utilização de cultivares resistentes é considerada a mais importante. No entanto, a resistência

genética não tem demonstrado estabilidade em relação ao tempo e ao local, principalmente devido à variabilidade genética das estirpes do patógeno e por alterações climáticas das diferentes regiões geográficas (Tung *et al.*, 1990). No Peru as cultivares ‘Coxamarca’ e ‘Molinera’ foram lançadas como resistentes, mas a resistência obtida foi superada por estirpes do patógeno existentes em locais de temperatura acima de 30 °C (Ciampi *et al.*, 1980).

Embora não existam cultivares com alto nível de resistência à murcha bacteriana, observa-se que qualquer nível de resistência tem se mostrado muito útil quando associado a outras medidas de controle, tais como: escolher áreas de plantio sem histórico da doença, preferir os plantios de inverno, plantar batata semente certificada, manejar a irrigação para evitar excesso de água e fazer rotação de culturas preferencialmente com gramíneas. Mesmo sendo um acontecimento muito raro, são encontradas cultivares que não foram melhoradas para resistência à murcha bacteriana, mas que apresentam consistentemente menor grau de ataque da doença. Isto pode ser explicado, pelo menos em parte, pelo fato de a resistência ser relacionada à adaptabilidade da cultivar a uma determinada região. No Brasil, a cultivar alemã Achat tem se sobressaído, com grau de resistência considerável quando comparada com cultivares estrangeiras amplamente plantadas, como Monalisa, Atlantic, Bintje, Baraka e Ágata, ou mesmo com cultivares nacionais como Baronesa, Catucha, Contenda e Cristal, selecionadas na região Sul, onde a murcha bacteriana é endêmica. O não florescimento da cultivar Achat impede que esta possa ser utilizada em cruzamentos com outros materiais comerciais para a obtenção de progênie resistente (Lopes *et al.*, 1998).

O desenvolvimento de cultivares de batata que apresentem resistência à murcha bacteriana associada a boas características agronômicas tem sido o objetivo de diversos institutos de pesquisas em todo o mundo, porém até o presente, poucas linhagens resistentes foram obtidas para esse patossistema. Materiais resistentes como o clone Cruza 148 possuem péssimas características agronômicas e a transferência de seus genes de resistência para outras linhagens comerciais não tem surtido efeito até o momento, principalmente pela transmissão de características indesejáveis à sua

progênie e à elevada suscetibilidade deste material a infecções latentes (Lopes *et al.*, 1998; Priou *et al.*, 2000).

Desde o início da década de 1980, várias fontes de resistência à doença foram encontradas em genótipos derivados de cruzamentos realizados no Centro Internacional de la Papa (CIP), em que pelo menos um dos genitores era resistente, normalmente proveniente de espécies não cultivadas do gênero *Solanum*, como *S. phureja*, *S. sparsipilum*, *S. chacoense* e *S. microdontum* (Schmiediche, 1985; Priou *et al.*, 2005). Desses cruzamentos, foi possível selecionar clones com alto grau de resistência à doença sem, entretanto, se obter imunidade, que dispensasse outras formas de controle. Além disso, o aspecto visual desses clones não era atrativo, o que levou à necessidade de se realizar uma seleção prévia para tipo de tubérculo antes de se avaliar para resistência à doença. Deste modo, o material selecionado pode ser utilizado como genitor em programas de melhoramento, que visam principalmente o aspecto visual do produto.

A Embrapa Hortaliças em colaboração com o CIP vem conduzindo projetos de identificação de clones resistentes à murcha bacteriana, como suporte ao programa de melhoramento genético em busca de cultivares com boas características comerciais e nível satisfatório de resistência à doença. Após vários anos de seleção e dezenas de milhares de combinações avaliadas, a Embrapa Hortaliças selecionou clones com alto nível de resistência à murcha bacteriana que florescem com facilidade e permitem cruzamentos para trabalhos de melhoramento genético da cultura. Entre os clones mais promissores selecionados destacam-se: ‘MB 03’, ‘MB 9721-01’, ‘MB 9846-01’, ‘384.515-1’ e ‘MB 9801-01’. Esses materiais além de apresentarem boa resistência à doença possuem características comerciais bem superiores ao padrão internacional de resistência, o clone Cruza 148.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o comportamento das progênies obtidas dos cruzamentos entre os clones resistentes da Embrapa Hortaliças com algumas cultivares de batata, tanto em fase juvenil em casa de vegetação, como em campo naturalmente infestado com a biovar 1 (raça 1) de *Ralstonia solanacearum*.



## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Entre os anos de 2002 e 2004 foram instalados os ensaios experimentais que avaliaram o desempenho de clones de batata desenvolvidos pelo programa de resistência à murcha bacteriana da Embrapa Hortaliças. Paralelamente, novos clones foram desenvolvidos e avaliados para esta característica. Os clones que já se encontravam em fase avançada de desenvolvimento, foram testados para resistência ao biovar 1 de *Ralstonia solanacearum* em campo naturalmente infestado e aqueles que foram sendo desenvolvidos ao longo da pesquisa, avaliados em condições artificiais (casa de vegetação) e/ou campo naturalmente infestado.

### 2.1. Desenvolvimento de novos clones de batata

Para o desenvolvimento dos novos clones de batata foram utilizados como parentais resistentes os clones da Embrapa Hortaliças que apresentaram maior resistência à murcha bacteriana em avaliações realizadas em períodos anteriores. O clone Cruza 148 (padrão internacional de resistência) também foi utilizado como parental resistente. Cultivares de batata atualmente plantadas no Brasil foram utilizadas nos cruzamentos visando a transferência de suas características agrícolas para a progênie em desenvolvimento.

#### 2.1.1. Parentais resistentes:

- (i) **'MB 03'**. Este clone anteriormente denominado '388.104-2' foi selecionado do cruzamento entre 'BR 63-76' e 'XY-9', realizado no CIP (Lopes *et al.*, 1998; Lopes *et al.*, 2004). O clone MB 03 foi recebido na Embrapa Hortaliças como semente botânica e tem apresentado resistência estável em avaliações em Brasília e no Rio Grande do Sul, para as biovars 1 e 2 de *R. solanacearum*, respectivamente. Outra característica favorável de 'MB 03' é sua boa capacidade de florescimento. É o clone de batata mais resistente à murcha bacteriana desenvolvido pelo programa de melhoramento da Embrapa Hortaliças.
- (ii) **'384.515-1'**. Resultante do cruzamento entre '7XY.1' x 'Katahdin' (realizado no CIP) foi recebido pela Embrapa Hortaliças em forma de plântulas *in vitro* em 1994. Em

avaliações realizadas em Brasília tem apresentado boa resistência ao biovar 1 de *Ralstonia solanacearum* em condições naturais de infecção. A boa capacidade de florescimento favorece sua utilização em cruzamentos.

(iii) **‘MB 9721-01’**. É um clone bastante promissor por apresentar bom aspecto visual. Em sua genealogia possui como mãe o genótipo ‘385.147-59’ (clone selecionado na Embrapa Hortaliças do cruzamento ‘B-71-241-2’ x ‘Y.84.012’, recebido como semente botânica do CIP); e como pai o clone 389.464-23 (selecionado no CNPH do cruzamento ‘BR63-5’ x ‘XY-6’, recebido como semente botânica do CIP). Possui florescimento abundante.

(iv) **‘Cruza 148’**. Clone de batata com extrema resistência à murcha bacteriana. Material que apresenta boa produção e baixa qualidade visual de tubérculos. É padrão internacional de resistência à doença (French *et al.*, 1998).

### **2.1.2. Parentais com características agronômicas:**

(i) **‘Monalisa’**. Cultivar de origem holandesa, resultante do cruzamento de ‘Bierma A1-287’ x ‘Colmo’. Caracteriza-se por apresentar plantas altas e de emergência lenta, com três a quatro hastes por planta, boa cobertura do solo e ciclo médio precoce. Tubérculos de formato alongado; olhos rasos; película amarelo-clara; lisa e brilhante. É uma cultivar com alto potencial produtivo (Melo & Buso, 1997; Pereira *et al.*, 2003).

(ii) **‘Baraka’**. Cultivar de origem holandesa, resultante do cruzamento de ‘SVP 50-358’ x ‘Avenir’. As plantas são de desenvolvimento bastante rápido, com poucas hastes por plantas, e com poucos tubérculos. Os tubérculos são alongados e achatados, com película amarela e lisa, fosca, olhos meio profundos e polpa creme. Embora não muito recomendado, pode ser utilizada para fritura. O ciclo da cultivar Baraka é médio/tardio (Melo, 1999).

(iii) **‘Asterix’**. Cultivar holandesa, obtida do cruzamento entre ‘Cardinal’ x ‘SVP Ve 709’. Como principais características desta cultivar, destacam-se a película rosada e o excelente teor de matéria seca, o que a torna ideal para frituras. Esta cultivar de batata é bastante plantada em regiões do Sul do Brasil (Pereira *et al.*, 2003).

## 2.2. Obtenção de clones resistentes à murcha bacteriana

Os cruzamentos entre os genitores resistentes à doença e os de boas características comerciais foram realizados pela EPAGRI, devido a problemas técnicos que inviabilizaram o desenvolvimento dessa etapa na Embrapa Hortaliças. Assim, as combinações foram direcionadas para gerar variabilidade a partir de clones resistentes selecionados previamente, em combinação com genótipos de boa aceitação comercial (Tabela 1).

Tabela 1. Cruzamentos realizados na EPAGRI para desenvolvimento de clones de batata com boas características comerciais e resistentes à murcha bacteriana. São Joaquim-SC, 2002.

Nº Cruzamento	Pedigree	Nº sementes obtidas
279	Cruza 148 x 384.515-1	267
271	9721-01 x Monalisa	1529
297	9721-01 x MB 03	653
273	384.515-1 x 9721-01	1280
274	Asterix x 384.515-1	441
280	SJ 98688 x 384.515-1	615
270	9721-01 x Baraka	1018
283	384.515-1 x Asterix	402
285	Cruza 148 x Baraka	458
305	MB 03 x 384.515-1	524
288	384.515-1 x Monalisa	304
272	9721-01 x 384.515-1	3950
287	MB 03 x Monalisa	186
298	384515-1 x SJ 98668	254
<b>Total</b>		<b>11881</b>

Algumas combinações não mostraram bom desempenho em testes realizados com inoculação artificial de *Ralstonia solanacearum*. Esses testes em fase juvenil (inoculação em bandeja) foram importantes para indicar os cruzamentos que apresentavam maior potencial de seleção de progênies desejáveis (dados não apresentados).

As sementes dos cruzamentos mais promissores (Tabela 2) sofreram processo de quebra de dormência (ácido giberélico, 200 ppm) e posteriormente, foram plantadas em casa de vegetação (telado). As mudas obtidas foram transplantadas para vasos (3 kg) contendo substrato estéril e irrigadas diariamente, de acordo com as necessidades hídricas das plantas, de modo a se obter plantas vigorosas e bem nutridas. Observando-se a presença de insetos vetores, conseguiu-se obter plantas de batata livres de vírus. Os tubérculos de cada clone foram colhidos com cerca de 80 dias após o plantio.

Dois tubérculos de cada clone foram plantados em Cristalina–GO, em campo de produção comercial da empresa *Hayashi Batatas*. A área utilizada para esta avaliação, historicamente não tem apresentado problemas com murcha bacteriana. Esta parceria entre a empresa privada e a Embrapa Hortaliças nos permitiu avaliar previamente as características comerciais dos clones, identificando ainda as melhores combinações para tipo de tubérculos. Os tratos fitossanitários e a condução da experimentação seguiram o protocolo adotado pela *Hayashi Batatas* para a manutenção de campo de produção de batata-semente, tendo em vista, que essas linhagens foram plantadas nas mesmas condições das plantas matrizes da empresa. Após 75 dias de cultivo, colheu-se separadamente os tubérculos dos 577 clones para número de tubérculos por planta, tamanho comercial de tubérculo, cor da película e formato do tubérculo, entre outras características desejáveis (Tabela 2).

Tabela 2. Avaliação de progênie de batata quanto ao desempenho de características agronômicas na *Hayashi Batatas*. Brasília, 2003.

Nº do cruzamento	Pedigree	Nº de clones avaliados
271	9721-01 x Monalisa	182
288	384515-1 x Monalisa	91
287	MB 03 x Monalisa	104
272	9721-01 x 384515-1	69
273	384515-1 x 9721-01	24
279	Cruza 148 x 384515-1	39
305	MB 03 x 384515-1	68
297	9721-01 x MB 03	21
<b>Total</b>		<b>577</b>

No ano de 2004, as linhagens de batata avaliadas em Cristalina para características comerciais foram testadas quanto à resistência à biovar 1 de *R. solanacearum*, em campo naturalmente infestado na Embrapa Hortaliças. Para efeito de comparação, foram utilizados como padrão suscetível as cultivares Monalisa e Bintje e como padrão resistente os clones Cruza 148, MB 03 e MB 9846-01. A incidência de murcha bacteriana verificada no experimento foi bastante elevada. Os riscos de “manchas de solo” sem a presença do patógeno foi reduzida em função da boa distribuição de genótipos suscetíveis em toda a área experimental.

Os clones não selecionados na *Hayashi Batatas* também foram colhidos e levados para a Embrapa Hortaliças para avaliação de resistência à murcha bacteriana, tendo em vista, que embora não apresentassem aspecto visual desejável, são potencialmente superiores à boa parte dos materiais já desenvolvidos por outros programas de melhoramento genético. Os ensaios foram instalados, lado a lado, em campo naturalmente infestado no dia 20 de abril de 2004.

Como houve somente uma multiplicação das linhagens em Cristalina-GO, a quantidade de tubérculos produzidos foi insuficiente para a instalação de um experimento com repetições para todos os tratamentos (genótipos). O número de plantas avaliadas para cada clone ficou entre 5 e 20, e os tratamentos que apresentavam quantidade maior de tubérculos foram avaliados com repetições. As plantas de cada clone foram avaliadas utilizando-se a variável incidência de plantas murchas, por um período que se estendeu entre os dias 15 de maio de 2004 e 25 de junho de 2004.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as plantas cultivadas na *Hayashi Batatas* apresentaram excelente aspecto visual, em função do bom manejo verificado na área de produção de batata-semente. Houve uma perda muito pequena de alguns clones em função da ocorrência de ‘canela-preta’ (*Erwinia carotovora*) na área da avaliação.

A seleção visual foi feita em função de diversos critérios técnicos, como: arquitetura da planta, número de hastes, tipo de folha, número de tubérculos produzidos, coloração da película e tamanho de tubérculos, formato dos tubérculos, profundidade de olhos etc. Os genótipos que apresentaram maior quantidade de características favoráveis foram pré-selecionados e identificados de acordo com a genealogia. Os materiais não selecionados também foram catalogados em função de uma provável resistência à murcha bacteriana. A frequência de genótipos selecionados para cada progênie pode ser visto na Tabela 3.

Tabela 3. Frequência de seleção dos clones de batata avaliados quanto a características comerciais em campo de produção da *Hayashi Batatas*. Brasília - DF, 2003.

Progênie	Pedigree	clones selecionados/avaliados	Frequência (%)
271	9721-01 x Monalisa	90/182	49,4
288	384515-1 x Monalisa	29/91	31,8
287	MB 03 x Monalisa	39/104	31,5
272	9721-01 x 384515-1	22/69	31,8
273	384515-1 x 9721-01	3/24	12,5
279	Cruza 148 x 384515-1	6/39	15,3
305	MB 03 x 384515-1	4/68	5,8
297	9721-01 x MB 03	7/21	33,3
<b>Total</b>		<b>200/577</b>	<b>34,6</b>

Do total de clones avaliados em Cristalina, 34,6% foram selecionados por apresentar boas características visuais. Como padrões de comparação foram utilizados tubérculos das cultivares Ágata e Mondial, materiais cultivados na *Hayashi Batatas* e que estão entre os mais plantados no Brasil. A produção individual de cada clone (peso

e número de tubérculos produzidos) também foi avaliada para se verificar, o potencial produtivo de cada clone (dados não apresentados).

A maior frequência de seleção foi verificada para a progênie 271 (9721-01 x Monalisa) por esta apresentar bom percentual de clones com tubérculos de aparência comercial. O bom aspecto visual dos genitores desta progênie contribuiu para o melhor desempenho desta combinação. Os maiores percentuais de seleção das progênies se deram na presença da cultivar Monalisa, em função de suas boas características visuais que foram transferidas para as gerações obtidas. Espera-se que não só essas características sejam expressas, mas também as de resistência encontradas nos outros genitores das combinações, representados pelos clones da Embrapa Hortaliças.

O clone 384515-1 e Cruza 148 foram os genitores que contribuíram para a menor transferência de características visuais desejáveis. Embora bastante resistente às biovares 1 e 2 de *Ralstonia solanacearum* o clone Cruza 148 não tem sido muito utilizado em programas de melhoramento devido à transferência de características indesejáveis à sua progênie (Lopes *et al.*, 1998, Priou *et al.*, 2000).

Dos 200 clones selecionados como portadores de boas características agrônômicas, apenas dois apresentaram bom desempenho quando avaliados para resistência à murcha bacteriana. Os materiais selecionados como de boas características agrícolas e resistentes à doença são 272#18 e 272#26, ambas são procedentes da progênie 272 (9721-01 x 384515-1), obtida do cruzamento de dois clones resistentes desenvolvidos na Embrapa Hortaliças (Tabela 3). A baixa frequência de seleção de genótipos resistentes à murcha bacteriana é comum em todos os programas de melhoramento (Priou *et al.*, 2005).

Seis clones de batata não selecionados para características comerciais em 2003 apresentaram boa resistência à murcha bacteriana. Embora estes materiais não tenham sido selecionados, apresentam razoáveis características comerciais e podem ser utilizados em cruzamentos para transferência de suas características. Genótipos resistentes como 'MB 03' e o padrão de resistência Cruza 148 apresentam qualidade muito inferior aos materiais selecionados como de boa resistência nesta avaliação. Porém, a resistência destes clones deve ser verificada em outros locais e época de plantio, para a confirmação da estabilidade desta resistência.

As avaliações realizadas em campo de produção de batata no ano de 2003 indicaram as melhores combinações para se agregar resistência à murcha bacteriana a bons aspectos comerciais. Novos cruzamentos foram realizados entre 'Monalisa' x 9721-01 e 'Monalisa' x MB 03 para a obtenção de outras progênes de batata e posterior verificação de seu desempenho agrônômico e de resistência. As sementes botânicas foram novamente produzidas na EPAGRI e enviadas a Embrapa Hortaliças. Cerca de 700 clones de batata provenientes desses cruzamentos foram desenvolvidos. A produção dos novos clones de batata seguiu a mesma metodologia descrita anteriormente, e os materiais desenvolvidos encontram-se preservados em câmara fria aguardando a verificação de seu desempenho em campo de murcha.

A metodologia apresentada para seleção de clones resistentes e que apresentem características comerciais mostrou-se satisfatória, em função da redução do tempo para obtenção dos materiais melhorados. O plantio dos clones em área comercial oferece agilidade ao programa devido a maior produção de tubérculos porém, maior número de clones deve ser utilizado em função do baixo percentual de seleção apresentado. Outra característica favorável é a não necessidade da etapa de cultura de tecidos, utilizada para a limpeza dos tubérculos pré-básicos, uma vez que os tubérculos foram produzidos em área sem a presença do patógeno.



## CAPÍTULO V

### AVALIAÇÃO DA RESPOSTA À MURCHA BACTERIANA DE ACESSOS DA COLEÇÃO MUNDIAL DE *Solanum chacoense*

#### 1. INTRODUÇÃO

A murcha bacteriana, causada pela bactéria *Ralstonia solanacearum*, constitui uma das maiores limitações ao cultivo da batata (*Solanum tuberosum*) em regiões de clima tropical, subtropical e zonas mais quentes de clima temperado em todo o mundo (Hayward, 1991). *Ralstonia solanacearum* é considerada como um dos mais importantes patógenos de plantas em todo o mundo devido às elevadas perdas que pode ocasionar em diversas culturas agrícolas. O agente causador da murcha bacteriana é endêmico em locais de clima subtropical e tropical. Nos anos 90, estirpes adaptadas a clima frio foram identificadas no oeste do continente europeu causando infecções latentes em tubérculos de batata (Janse, 1996).

O significado dessa doença pode ser percebido pelo rigor da legislação vigente para a certificação de batata-semente. Uma só planta afetada é suficiente para a condenação de todo o campo de produção (Lopes, 2005). A medida se justifica pela possibilidade de plantas sem sintomas produzirem tubérculos com infecção latente, que servem de fonte de inóculo para a disseminação da doença (Oliveira *et al.*, 2003).

O controle da murcha bacteriana é muito difícil quando altas temperatura e umidade, fatores favoráveis à doença, ocorrem durante o cultivo da batata. Deve-se considerar ainda a complexidade que envolve a sobrevivência da bactéria no solo e o seu amplo círculo de plantas hospedeiras (Hayward, 1994). *Ralstonia solanacearum* é extremamente variável, sendo adaptada a um grande número de plantas hospedeiras, sob as mais variadas condições. A bactéria está associada a mais de 200 espécies de plantas cultivadas e silvestres, em pelo menos, 50 famílias diferentes (Hayward, 2000). Devido à grande variabilidade das estirpes bacterianas, *R. solanacearum* tem sido classificada em cinco raças de acordo com a espécie hospedeira (Buddenhagen *et al.*, 1962) e em seis biovars de acordo com a habilidade de digerir ou oxidar diferentes

fontes de carbono (Hayward, 1991). Apesar de bastante utilizada, a classificação em raças e biovars não possui uma divisão claramente definida entre as mesmas. A raça 1 sobrepõe-se a divisão de biovars e não constitui um agrupamento natural, mas compreende diferentes fenótipos com distintos genótipos e filogenia (Hayward, 1994). As estirpes que, sob condições naturais, infectam a batata são classificadas como biovar 1 (raça 1), ocasionam doença basicamente de solo, ocorrem em clima mais quente (26 a 36 °C) e possuem uma maior relação de espécies hospedeiras cultivadas e silvestres. As estirpes da biovar 2 (raça 3), que ocorrem em regiões mais frias (15 a 20 °C), possuem maior capacidade de produzir infecções latentes nos tubérculos e apresentam uma restrita relação de hospedeiros, sendo a batata o principal (Hayward, 1991).

Por ser um patógeno adaptado a um grande número de plantas hospedeiras, sob as mais variadas condições de clima e solo, torna-se difícil desenvolver estratégias efetivas de controle, devido, principalmente, à falta de conhecimentos básicos sobre a ecologia e evolução de *R. solanacearum*. Estratégias que visem a redução de incidência da murcha bacteriana, como parte do manejo integrado, são essenciais para complementar os níveis de resistência de cultivares de batata, em ambientes favoráveis à doença sob alta pressão de inóculo. Dentre as estratégias para o controle da murcha bacteriana, a utilização de cultivares resistentes é considerada a mais importante (French *et al.*, 1998). Entretanto, a resistência genética em batata tem demonstrado instabilidade em virtude da variabilidade das estirpes do patógeno nos diferentes locais e por alterações do ambiente, principalmente de temperatura nas diferentes regiões climáticas (Tung, 1990).

As espécies selvagens relacionadas com a batata têm fornecido, via cruzamentos naturais, diversos fatores de resistência utilizados no melhoramento genético desta hortaliça (Gebhardt & Valkonen, 2001). Fontes de resistência a *R. solanacearum* têm sido detectadas em *S. tuberosum* (Jaworski *et al.*, 1980; Lopes & Giordano, 1983), *S. phureja* (Thurston & Lozano, 1968), e nas espécies selvagens *S. raphanifolium*, *S. sparsipilum*, *S. microdontum* (Tung & Rasco Jr., 1987), *S. commersonii* (Laferriere *et al.*, 1999) e *S. stenotomum* (Fock *et al.*, 2005). No entanto essa resistência não têm apresentado boa estabilidade em relação à doença e podem servir como importantes agentes disseminadores da murcha bacteriana devido à

presença de tubérculos com infecções latentes (Priou *et al.*, 2005). Devido as facilidades de cruzamento, a resistência à *R. solanacearum* derivada de *S. phureja* tem sido bastante utilizada em programas de melhoramento de batata desde a década de 1970. Porém, esta resistência mostrou ser inadequada em razão da alta especificidade da raça da bactéria e da sensibilidade à temperatura. O grau de resistência à murcha bacteriana parece estar associado também ao nível de adaptação do clone de batata a determinado ambiente. Portanto, genes que possibilitem uma melhor adaptação do genótipo a condições ambientais que predisponham à doença devem ser igualmente incorporados, para que se tenham um melhor nível de resistência (Tung *et al.*, 1990).

*Solanum chacoense* Bitter é uma espécie selvagem diplóide (2x) com ocorrência natural em uma grande extensão territorial na América do Sul englobando Argentina, Bolívia, Paraguai, Uruguai e Brasil (Hawkes, 1990). Os habitats desta espécie variam desde o nível do mar até 3.500m de altitude, na cordilheira dos Andes (Miller & Spooner, 1996), coincidindo com muitas áreas de ocorrência endêmica de *R. solanacearum*. Esta espécie selvagem é altamente polimórfica e seu germoplasma é uma potencial fonte de genes de interesse para o melhoramento genético da batata (Buso *et al.*, 1999; 2000). No entanto, a coleção mundial de *S. chacoense* não foi ainda plenamente avaliada para resistência a *R. solanacearum*. A identificação de novas fontes de resistência à murcha bacteriana é fator fundamental para se ampliar à base genética da resistência à doença. Outros materiais do gênero *Solanum* que possam conferir resistência à doença e não proporcionar infecção latente em seus tubérculos são essenciais no desenvolvimento de cultivares de batata, tendo em vista sua importância crescente na disseminação do patógeno. Dentro deste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a resistência a *R. solanacearum* de 128 acessos da coleção mundial de germoplasma de *S. chacoense*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Uma coleção de 128 acessos de *S. chacoense* procedentes do Inter-Regional Potato Introduction Station, Sturgeon Bay, EUA, foi avaliada quanto à resposta a murcha bacteriana em Brasília, DF. Lotes de sementes verdadeiras de cada população foram tratados com solução de ácido giberélico (200 ppm) para quebra de dormência e depois secos à temperatura ambiente ( $\pm 25$  °C), por 24 h. A semeadura dos diferentes acessos avaliados foi realizada no dia 20 de março de 2003. As sementes foram distribuídas em caixas de plástico tipo 'gerbox' (20 x 20 x 5 cm – 20 sementes por caixa) sobre um papel filtro umedecido com água esterilizada. Para promover melhor germinação, as caixas foram incubadas em câmara de crescimento à temperatura de  $20 \pm 1$  °C, com 14 h de fotoperíodo. Após a germinação das sementes, 14 plântulas de cada acesso de *S. chacoense* foram transplantadas para vasos (capacidade 1,0 litro), contendo mistura de solo estéril, em casa de vegetação. O transplântio dos diferentes genótipos de *S. chacoense* foi realizado onze dias após a semeadura.

Os acessos de *S. chacoense* foram inoculados em 22 de maio de 2003. Para inoculação, utilizou-se uma estirpe de *R. solanacearum*, pertencente à raça 1, biovar 1, obtida de plantas de batata com sintomas de murcha bacteriana, na Embrapa Hortaliças. Em avaliações anteriores, este isolado mostrou elevada agressividade para plantas de batata e tomate. As colônias de *R. solanacearum* utilizadas na inoculação foram cultivadas em meio Kelman (incubada a 27 °C/48 h). O preparo do inóculo foi realizado pela adição de água estéril a cada placa, raspagem da superfície do meio e ajuste da concentração de inóculo para  $10^8$  ufc/ml, em espectrofotômetro, segundo equação previamente determinada (Lopes *et al.*, 1994). Para a inoculação cerca de 15ml da suspensão bacteriana ( $10^8$  ufc/ml) foi adicionada a cada vaso. Para cada acesso de *S. chacoense* foram avaliadas quatorze plantas, perfazendo um total de 1792 genótipos (14 plantas x 128 acessos). Como controle negativo, uma planta de cada acesso, sem inoculação, foi utilizada.

Oito avaliações da incidência de murcha bacteriana para cada acesso de *S. chacoense* foram realizadas, com início em 30 de maio de 2003 e término em 20 de junho de 2003. Os materiais identificados como resistentes foram novamente avaliados

para este isolado de *R. solanacearum* em um conjunto de três avaliações ao longo de seis meses.

Os genótipos que apresentaram resistência ao primeiro isolado utilizado foram submetidos a uma nova avaliação de resistência com outros isolados da bactéria. A mesma metodologia descrita nos capítulos anteriores foi utilizada para esta avaliação. Trinta e duas plantas de cada genótipo remanescente foram avaliadas para cada isolado. Para se obter número suficiente de plantas necessárias nesta avaliação, foram realizadas propagações vegetativas dos diferentes acessos considerados resistentes. Os cinco isolados de *R. solanacearum* utilizados foram procedentes de diferentes localidades do Brasil e encontravam-se na coleção de bactérias do laboratório de fitopatologia da Embrapa Hortaliças. Foram utilizados os isolados RS229 (GO, biovar 1), RS222 (SP, biovar 1), RS231 (MG, biovar 2), RS212 (BA, biovar 2) e RS164 (RS, biovar 2). Os isolados, preservados em água, foram cultivados em placas com meio Kelman, acrescido de tetrazólio (Kelman, 1954), para seleção das colônias virulentas. As placas foram incubadas a 27 °C, por dois dias, na ausência de luz. Depois de identificadas as colônias virulentas os isolados foram transferidos para placas de Petri que continham meio Kelman, sem tetrazólio, a partir de colônias isoladas. As placas foram incubadas nas mesmas condições anteriormente citadas. O preparo do inóculo foi feito pela adição de água estéril a cada placa, raspagem da superfície do meio e ajuste da concentração de inóculo para  $10^8$  ufc/ml, em espectrofotômetro, segundo equação previamente determinada (Lopes *et al.*, 1994). Para a inoculação das plantas remanescentes foram utilizados, para cada isolado do patógeno, 15 ml de suspensão bacteriana ( $10^8$  ufc/ml). A inoculação deste ensaio foi realizada em 24 de abril de 2004.

Após a inoculação, as plantas permaneceram na casa de vegetação, onde a temperatura variou de 17 a 38 °C. Os vasos foram irrigados diariamente, de modo a manter o solo bem úmido, favorecendo assim, a ocorrência da doença.

As avaliações da incidência de murcha bacteriana foram realizadas conferindo-se o número de plantas com sintomas da doença para cada repetição. Cinco avaliações da incidência de murcha bacteriana foram realizadas, com início em 03 de maio de 2004 e término em 24 de maio de 2004.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O início da manifestação dos sintomas nas plantas dos acessos de *S. chacoense* ocorreu cinco dias após a inoculação. As avaliações foram realizadas durante um período de três meses, quando se observou um aumento progressivo no número de plantas murchas para cada acesso avaliado. As plantas de cada acesso não inoculadas (testemunhas) não apresentaram sintomas da doença durante todo o período da experimentação.

Dos 1.792 genótipos de *S. chacoense* avaliados, 55 (3%) apresentaram níveis de resistência elevados à biovar 1 de *R. solanacearum* durante os primeiros 30 dias de avaliação. Estes genótipos selecionados nessa fase da avaliação pertenciam a 37 diferentes acessos de *S. chacoense*. Os outros 91 acessos observados foram considerados muito suscetíveis à biovar 1 de *R. solanacearum*.

As plantas selecionadas na primeira fase foram conduzidas na casa de vegetação por mais 60 dias, período este em que foram se observando novos sintomas de murcha bacteriana em alguns dos tratamentos. Após este período de observação, foram selecionados somente 18 clones de *S. chacoense*, pertencentes a 15 acessos da coleção mundial.

O solo utilizado para as duas primeiras avaliações (após ser peneirado e misturado) foi utilizado para uma nova avaliação da resistência dos clones de *S. chacoense*. Após as três avaliações realizadas para resistência à murcha bacteriana, foram selecionados seis genótipos extremamente resistentes ao biovar 1 (raça 1) de *R. solanacearum* procedente de campo infestado da Embrapa Hortaliças. Cada genótipo selecionado era correspondente a um diferente acesso de *S. chacoense*. Considerando os 128 acessos avaliados, 4,6% mostraram resistência ao biovar 1 de *R. solanacearum* utilizado. Do total de plantas avaliadas (1.792) somente 0,3% mostraram-se resistentes à murcha bacteriana. Os acessos selecionados como altamente resistentes foram PI 414153, PI 472810, PI 209412, PI 230580, PI 189221 e PI 320289.

A baixa frequência de seleção de clones para resistência à murcha bacteriana tem sido verificada em todos os programas de melhoramento no mundo. No CIP de 1.343 genótipos avaliados, nenhum pertencente à espécie *S. chacoense*, somente 25

clones foram selecionados por apresentar boa resistência à murcha bacteriana, embora tenha sido verificada elevada taxa de infecção latente (30%) nos tubérculos selecionados (Priou *et al.*, 2005). Ao avaliarem aproximadamente 80.000 clones de batata provenientes de sementes verdadeiras, Lopes *et al.* (1998) encontraram cerca de 1.500 clones (1,8%) com características promissoras para resistência e bons atributos comerciais. Destes materiais selecionados, somente 30 clones mostraram boa resistência quando expostos em solos infestados com a biovar 1, raça 1, de *R. solanacearum*.

A inoculação de *R. solanacearum* diretamente no solo mostrou-se eficaz, tendo em vista, o elevado incidência de murcha bacteriana observada para os diferentes genótipos avaliados. Outros métodos de inoculação como a imersão das raízes em suspensão bacteriana, após o corte da extremidade das raízes, mostra-se muito drástico além de não representar a situação natural de infecção.

González *et al.* (1973) inocularam plântulas de batata oriundas de sementes botânicas, com idade de 20 dias, vertendo suspensão de *R. solanacearum* no solo, com posterior corte das raízes, em casa de vegetação. Os autores observaram que, 14 dias após a inoculação, alguns genótipos apresentavam até 90% de plântulas murchas e concluíram que este método de inoculação é extremamente drástico.

Lima *et al.* (1996) utilizaram como método de inoculação a imersão da bandeja contendo plântulas de batata em suspensão bacteriana por 10 minutos, com posterior adição de 3 ml de suspensão bacteriana ( $10^8$  ufc/ml) diretamente no colo da plântula em cada célula. Mesmo sem usar o método de ferimento de raízes o método utilizado fora bastante drástico em função da elevada suscetibilidade apresentada pelos materiais avaliados. Isso pode ter reduzido as chances de sobrevivência de genótipos com baixo nível de resistência, mas possui como vantagem, a possibilidade de limitar o número de genótipos selecionados em função da eliminação daqueles de resistência intermediária.

Os genótipos de *S. chacoense* que apresentaram resistência ao primeiro isolado utilizado, sofreram processo de propagação vegetativa para que fossem observados quanto a resistência a outras variantes de *R. solanacearum*. Esse processo foi um pouco lento em função de se obter número suficiente de plantas de cada genótipo para as diferentes repetições e tratamentos utilizados (5 isolados do patógeno e 16 repetições de

2 plantas). As estirpes da bactéria utilizadas, procedentes de diferentes localidades do Brasil, foram pertencentes às biovars 1 e 2. Os resultados obtidos mostraram que existe uma especialização ao nível de resistência e patogenicidade entre as estirpes testadas e os genótipos avaliados (Tabela 1).

Tabela 1. Comportamento de genótipos de *Solanum chacoense* a diferentes estirpes de *Ralstonia solanacearum* avaliado pela porcentagem de plantas murchas. Brasília-DF, 2004.

<i>S. chacoense</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>				
	RS 229*	RS 222	RS 231	RS 212	RS 164
PI 414153	81,2**	75,0	90,6	81,2	100,0
PI 472810	84,3	<b>0,0</b>	81,2	56,2	78,1
PI 209412	90,6	43,7	78,1	71,8	37,5
PI 230580	50,1	<b>0,0</b>	30,3	<b>0,0</b>	62,5
PI 189221	84,3	43,7	75,0	81,2	71,8
PI 320289	89,5	71,8	81,2	100,0	100,0

\* RS 229 e RS 222 são estirpes da biovar 1; RS 231, RS 212 e RS 164 são estirpes da biovar 2.

\*\* Porcentagem de plantas com sintomas de murcha bacteriana. Valores médios de 32 plantas avaliadas.

Os resultados demonstram a complexidade de se encontrar em um único genótipo resistência efetiva para diferentes variantes de *R. solanacearum*. Todas as estirpes utilizadas na avaliação comportaram-se como virulentas e apresentaram diferenças com relação à agressividade.

O genótipo PI 472810 foi altamente resistente ao isolado RS 222, pertencente à biovar 1, mas não mostrou essa mesma eficiência em relação às outras variantes do patógeno. O PI 230580 mostrou elevada resistência aos isolados RS 222 e RS 212, biovars 1 e 2, respectivamente, mas assim como o PI 472810, foi suscetível aos demais isolados utilizados nesta avaliação. Resistência específica a uma determinada variante do patógeno foi relatada no Peru para as cultivares derivadas de *S. phureja*, Coxamarca e Molinera (Ciampi *et al.*, 1980). Em *Capsicum*, resistência do tipo biovar-



específica tem sido observadas para biovares 1 e 3 (Lopes & Boiteux, 2004). A especificidade da resistência também ocorre em tomateiro (Lopes *et al.*, 1994). Nenhum dos materiais de *S. chacoense* avaliados mostrou resistência aos isolados RS 229, RS 231 e RS 164, que provocaram alta incidência de murcha bacteriana em todas as repetições da avaliação. A utilização de maior quantidade de genótipos para cada acesso de *S. chacoense* deve ser observada, tendo em vista a maior possibilidade de se encontrar materiais com resistência mais efetiva, em função do baixo percentual de seleção de genótipos resistentes à murcha bacteriana em todas as fontes até agora utilizada.

O germoplasma de *S. chacoense* apresenta diversos genes de interesse para resistência a doenças e insetos (para revisão ver Buso *et al.*, 2000). Em relação à murcha bacteriana, conclui-se que o germoplasma de *S. chacoense*, embora coletado em áreas endêmicas de *R. solanacearum*, não mostrou-se como fonte promissora de genes de resistência de amplo espectro. Devido a questão de auto-incompatibilidade, que obriga cruzamentos entre diferentes plantas de um mesmo acesso, recomenda-se uma busca mais intensa por germoplasma de *S. chacoense* resistente a variantes de *R. solanacearum* especialmente nos genótipos PI 230580 e PI 472810.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA BATATA (ABBA). Batata brasileira: área, produção e produtividade. [www.abbabatatabrasileira.com.br/brasil\\_area.htm](http://www.abbabatatabrasileira.com.br/brasil_area.htm). (consultado em 10 de novembro de 2005)

ALVAREZ, A.M.; TROTTER, K.J.; SWAFFORD, J.M.; BERESTECKY, Q.Yu.; MING, R.; HEPPELRY, P.R.; ZEE, F. Characterization and detection of *Ralstonia solanacearum* strains causing bacterial wilt of ginger in Havaí. In: ALLEN, C.; PRIOR, P.; HAYWARD, A.C. (Eds.). **Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* specieux complex**. St. Paul: APS, p. 471-477, 2005.

ARAUD-RAZOU, I.; VASSE, J.; MONTROZIER, H.; ETCHEBAR, C.; TRIGALET, A. Detection and visualization of the major acidic exopolysaccharide of *Ralstonia solanacearum* and its role in tomato root infection and vascular colonization. **European Journal of Plant Pathology**, v. 104, p. 795-809, 1998.

BIOSCA, E.G.; CARUSO, P.; BERTOLINI, E.; ÁLVAREZ, B.; PALOMO, J.L.; GORRIS, M.T.; LÓPES, M.M. Improved detection of *Ralstonia solanacearum* in culturable and VBNC state from water samples at low temperatures. In: ALLEN, C.; PRIOR, P.; HAYWARD, A.C. (Eds.). **Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* specieux complex**. St. Paul: APS, p. 501-506, 2005.

BOSHOU, L. A broad review and perspective on breeding for resistance to bacterial wilt. In: ALLEN, C.; PRIOR, P.; HAYWARD, A.C. (Eds.). **Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* specieux complex**. St. Paul: APS, p. 225-238, 2005.

BOUCHER, C.A.; BARVERIS, P.A.; TRIGALET, A.P.; DEMERY, D.A. Transposon mutagenesis of *Pseudomonas solanacearum*: isolation of Tn5-induced avirulent mutants. **Journal General Microbiology**, v. 131, p. 2449-2457, 1985.

BOUCHER, C.A.; VAN GIJSEGEM, F.; BARBERIS, P.A.; ARLAT, M.; ZISCHEK, C. *Pseudomonas solanacearum* genes controlling both pathogenicity on tomato and hypersensitivity on tobacco are clustered. **Journal of Bacteriology**, v. 169, p. 5626-5632, 1987.

BOUCHER, C.; GENIN, S. The *Ralstonia solanacearum*-plant interaction. In: TALBOT, N.J. Ed. **Annual Plant Reviews: Plant-pathogen interactions**, v. 11, cap. 4, 2004.

BOWMAN, J.E.; SEQUEIRA, L. Resistance to *Pseudomonas solanacearum* in potato: infectivity titration in relation to multiplication and spread of the pathogen. **American Potato Journal**, v.59, p. 155-163, 1982.

BRUMBLEY, S.M.; CARNEY, B.F.; DENNY, T.P. Phenotype conversion in *Pseudomonas solanacearum* due to spontaneous inactivation of *PhcA*, a putative *LysR* transcriptional regulator. **J. Bacteriol.**, v. 175, p. 5477-5487, 1993.

BUDDENHAGEN, I.; KELMAN, A. Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 12, p. 203-230, 1964.

BUDDENHAGEN, I.W.; SEQUEIRA, L.; KELMAN, A. Designations of races of *Pseudomonas solanacearum*. **Phytopathology**, v.52, p.726, 1962. (abstract)

BUSO, J.A.; BOITEUX, L.S.; PELOQUIN, S.J. Comparison of haploid Tuberosum-*Solanum chacoense* versus *Solanum phureja*-haploid Tuberosum hybrids as staminate parents of 4x-2x progenies evaluated under distinct crop management systems **Euphytica**, v.109, p.191-199, 1999.

BUSO, J.A.; BOITEUX, L.S.; PELOQUIN, S.J. Evaluation of 4x-2x progenies from crosses between potato cultivars and haploid Tuberosum-*Solanum chacoense* hybrids under long-day conditions. **Ann. Appl. Biol.**, v. 136, p. 35-40, 2000.

CAMPBELL, C.L.; MADDEN, L.V. Temporal analysis of epidemics I: Description and comparison of disease progress curves. *In*: CAMPBELL, C.L.; MADDEN, L.V. (Eds.). **Introduction to plant disease epidemiology**. New York, p. 161-202, 1990.

CHOER, E. Origem e evolução. *In*: PEREIRA, A.S.; DANIELS, J. (Ed.). **O cultivo da batata na região sul do Brasil**. Brasília, DF. Embrapa Informação Tecnológica, p. 57-68, 2003.

CIAMPI, L.; SEQUEIRA, L. Multiplication of *Pseudomonas solanacearum* in resistant potato plants and the establishment of latent infections. **American Potato Journal**, v. 57, p. 319-329, 1980.

COOK, D.; BARLOW, E.; SEQUEIRA, L. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphisms with DNA probes that specify virulence and the hypersensitive response. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 2. p. 113-121, 1989.

COOK, D.; SEQUEIRA, L. Strain differentiation of *Pseudomonas solanacearum* by molecular genetic methods. *In*: HAYWARD, A.C.; HARTMAN, G.L. **Bacterial wilt: The disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum***. Wallingford: CAB International, p. 77-93, 1994.

DENNY, T.P.; BAEK, S.R. Genetic evidence that extracellular polysaccharide is a virulence factor of *Pseudomonas solanacearum*. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 4, p. 198-206, 1991.

DIANESE, J.C.; DRISTIG, M.C.G. Strain characterization of *Pseudomonas solanacearum* based on membrane protein patterns. *In*: HAYWARD, A.C.; HARTMAN, G.L. (Eds.) **Bacterial Wilt: The disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum***. Wallingford: CAB International, p.113-121, 1994.

ELPHINSTONE, J.G. Inheritance of resistance to bacterial diseases. *In*: BRADSHAW, J.E.; MACKAY, G.R. (Eds.). **Potato genetics**. Wallingford, UK: CAB International, p. 429-446, 1994.

ELPHINSTONE, J.G.; ALEY, P. Integrated control of bacterial wilt potato in the warm tropics of Peru. *In*: International bacterial wilt conference, 1992, Taiwan. **Proceedings...** Canberra: ACIAR, p. 276-283, 1993.

ELPHINSTONE, J.G., HENNESSY, J., WILSON, J.K. & STEAD, D.E. Sensitivity of different methods for the detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tuber extracts. **EPPO Bulletin** 26:663-678. 1996.

ELPHINSTONE, J.G.; STANFORD, H.M.; STEAD, D.E. Detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tubers, *Solanum dulcamara* and associated irrigation water. *In*: International Bacterial Wilt Symposium, 1997, Guadeloupe, **Reports...** Paris: INRA, p. 133-139, 1998.

ELPHINSTONE, J.G. The current bacterial wilt situation: a global overview. *In*: ALLEN, C.; PRIOR, P.; HAYWARD, A.C. (Eds.). **Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex**. St. Paul: APS, p. 9-28, 2005.

ENGEL, F. Exploration of the Chilca Canyon, Peru. **Research Report Current Anthropol**, v. 11, p.55-58, 1970.

FEGAN, M.; PRIOR, P. How complex is the “*Ralstonia solanacearum* species complex”. *In*: ALLEN, C.; PRIOR, P.; HAYWARD, A.C. (eds.). **Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex**. St. Paul: APS, p. 449-461, 2005.

FOCK, I.; LUISETTI, J.; COLLONNIER, C.; VEDEL, F.; DUCREUX, G.; KODJA, H.; SIHACHAKR, D. *Solanum phureja* and *S. stenotomum* are sources of resistance to *Ralstonia solanacearum* for somatic hybrids of potato. *In*: ALLEN, C.; PRIOR, P.; HAYWARD, A.C. (Eds.). **Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex**. St. Paul: APS, p. 253-259, 2005.

FORTES, G.R.L.; PEREIRA, J.E.S. Classificação e descrição botânica. *In*: PEREIRA, A.S.; DANIELS, J. (Eds.). **O cultivo da batata na região sul do Brasil**. Brasília, DF. Embrapa Informação Tecnológica, p. 69-79, 2003.

FRENCH, E.R.; ANGUIZ, R.; ALEY, P. The usefulness of potato resistance to *Ralstonia solanacearum*, for the integrated control of bacterial wilt. *In: PRIOR, P., ALLEN, C.; ELPHINSTONE, J. (Eds.). Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects.* INRA. Berlin, p. 381-385, 1998.

FRENCH, E.R. Strategies for integrated control of bacterial wilt of potatoes. *In: HAYWARD, A.C.; HARTMAN, G.L. (Eds.) Bacterial Wilt: The disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum.* Wallingford: CAB International, p.199-207, 1994.

FRENCH, E.R., ALEY, P., TORRES, E. & NYDEGGER, U. Diversity of *Pseudomonas solanacearum* in Peru and Brazil. *In: HARTMAN, G.L.; HAYWARD, A.C. (Eds.) Bacterial Wilt. Canberra, ACIAR Proceedings*, p. 70-77, 1993

GEBHARDT, C.; VALKONEN J.P.T. Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome. *Annual Review Phytopathology*, v.39, p.79–102, 2001.

GENIN, S.; BOUCHER, C. *Ralstonia solanacearum*: secrets of a major pathogen unveiled by analysis of its genome. *Molecular Plant Pathology*, v. 3, p. 111-118, 2002.

GILLIS, M.; VAN, T.V.; BARDIN, R.; GOOR, M.; HEBBAR, P.; WILLEMS, A.; SEGERS, P.; KERSTERS, K.; HEULIN, T.; FERNANDEZ, M.P. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N<sub>2</sub>-fixing isolates from rice in Vietnam. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v. 45, p. 274-289, 1995.

GILLINGS, M.; FAHY, P. Genomic fingerprinting and PCR analysis: rapid, sensitive and inexpensive means of differentiating strains of *Pseudomonas solanacearum*. *In: International Bacterial Wilt Conference, 1992, Taiwan. Proceedings...Canberra: ACIAR*, p. 85-92, 1993.

GONZALES, L.C.; SIQUEIRA, L.; ROWE, P.R. A root inoculation technique to screen potato seedlings for resistance to *Pseudomonas solanacearum*. *American Potato Journal*, v. 50, p. 96-104, 1973.

GREY, B.E. & STECK, T.R. The viable but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* may be involved in long-term survival and plant infection. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, p. 3866-3872, 2001.

HAMESTER, W.; HILLS, V. World catalogue of potato varieties. Berlin, *Agrimedia*, 1999.

HAYWARD, A.C. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 27, p. 265-277, 1964.

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

HAYWARD, A.C. *Ralstonia solanacearum*. In: **Encyclopedia of Microbiology** (Ed. By Lederberg, J.), v. 4. San Diego: Academic Press, p. 32-42. 2000.

HAYWARD, A.C. Systematics and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. In: HAYWARD, A.C.; HARTMAN, G.L. (Eds.) **Bacterial Wilt: The disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum***. Wallingford: CAB International, p.123-135, 1994.

HAWKES, J.G. **The Potato: Evolution, Biodiversity and Genetic Resources**. Belhaven Press, Oxford, UK. 1990.

HE, L. Y.; SEQUEIRA, L.; KELMAN, A. Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from China. **Plant Disease**, v. 67, p. 1357-1361, 1983.

HERNÁNDEZ, Y.; MARINÓ, N.; TRUJILLO, G.; URBINA DE NAVARRO, C. Invasión de *Ralstonia solanacearum* en tejidos de tallos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). **Rev. Fac. Agron.**, v. 22, p. 181-190, 2005.

HUANG, Q.; ALLEN, C. An exo-poly-alpha-D-galacturonosidase, PehB, is required for wild-type virulence of *Ralstonia solanacearum*. **J. Bacteriol.**, v. 179, p. 7369-7378, 1997.

JANSE, J.D. Potato brown rot in Western Europe – history, present occurrence and some remarks on possible origin, epidemiology and control strategies. **Bull. OEPP**, v. 26, p. 679-695. 1996.

JAWORSKI, C.A.; WEBB, R.E.; GOTH, R.W.; PHATAK, S.C. Relative resistance of potato cultivars to bacterial wilt. **American Potato Journal**, v. 57, n.4, p. 159-165, 1980.

JEGER, M.J. Analysis of disease progress as a basis for evaluating disease management practices. **Annual Review Phytopathology**, v. 42, p. 61-82, 2004.

JIA, S.R.; QU, X.M.; FENG, L.X.; TANG, T.; TANG, Y.X.; LIU, K.; ZHENG, P.; ZHAO, Y.L.; BAI, Y.Y.; CAI, M.Y. Development of potato clones with enhanced resistance to bacterial wilt by introducing antibacterial peptide gene. **Sci Ag. Sinica**, v. 31, p. 13-18, 1998.

JOHNSON, J. L.; PALLERONI, N. J. Deoxyribonucleic acid similarities among *Pseudomonas solanacearum* species. **International Journal Systematic Bacteriology**, v.39, p.230-235, 1989.

KAO, C.C.; BARLOW, E.; SEQUEIRA, L. Extracellular polysaccharide is required for wilt-type virulence of *Pseudomonas solanacearum*. **J. Bacteriol.**, v. 174, p. 1068-1071, 1992.

KELMAN, A. The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. **Phytopathology**, v. 44, p. 693-695, 1954.

KELMAN, A.; HARTMAN, G.L.; HAYWARD, A.C. Introduction. *In*: HAYWARD, A.C.; HARTMAN, G.L. (Eds.) **Bacterial Wilt: The disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum***. Wallingford: CAB International, p.1-7, 1994.

LAFERRIERE, L.T.; HELGESON, J.P.; ALLEN, C. Fertility *Solanum tuberosum* + *Solanum commersonii* somatic hybrids as sources of resistance to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 98, n. 8, p. 1272-1278, 1999.

LEMAGA, B.; KAKUHENZIRE, R.; KASSA, B.; EWELL, P.T.; PRIOU, S. Integrad control of potato bacterial wilt in eastern África: the experience of african highlands initiative. *In*: ALLEN, C.; PRIOR, P.; HAYWARD, A.C. (Eds.). **Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* specieux complex**. St. Paul: APS, p. 145-157, 2005.

LI, X.; DORSCH, M.; DEL DOT, T.; SLY, L.I.; STACKEBRANDT, E.; HAYWARD, A.C. Phylogenetic studies of the rRNA group II pseudomonads based on 16S rRNA gene sequences. **Journal Applied Bacteriology**, v. 74, p. 324-329, 1993.

LIMA, M.F.; LOPES, C.A.; MELO, P.E. Seleção de genótipos de batata no estágio de plântulas para resistência à murcha bacteriana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 31, p. 249-257, 1996.

LIMA NETO, A.F. **Resistência de genótipos de tomateiro à *Ralstonia solanacearum*, agente da murcha bacteriana**. Lavras: UFLA, 2001, 90 p. (Dissertação de Mestrado)

LOPES, C.A. **Murchadeira da batata**. Itapetininga, SP: Publicação técnica – ABBA, 65 p, 2005.

LOPES, C.A.; QUEZADO-DUVAL. A.M.; FUROMOTO, O.; BUSO, J.A.; MELO, P.E.; SOUZA, Z.S.; DUARTE, V.; LIMA NETO, A.F. Seleção de clones de batata para resistência à murcha bacteriana. **Batata Show**, ano 4, n.10, 2004.

LOPES, C.A.; GIORDANO, L.B. Avaliação da resistência de oito clones e três cultivares de batata (*Solanum tuberosum* L.) à murcha bacteriana causada por *Pseudomonas solanacearum*. **Horticultura Brasileira**, v. 1, p. 33-35, 1983.

LOPES, C.A., SANTOS, M., GOEPFERT JUNIOR, F. & NOGUEIRA, P. Condenação de campos de certificação de batata-semente pela murcha bacteriana no Brasil, safra 1986/1987. **Horticultura Brasileira**, v. 8, p.14-16, 1990.

LOPES, C. A. Ecologia de *Pseudomonas solanacearum*. In: Taller sobre enfermedades bacterianas de la papa, 1993, Brasília, **Memórias...** Brasília: Embrapa/CNPH, p. 17-22, 1994.

LOPES, C.A.; QUEZADO-SOARES, A.M.; MELLO, P.E. Differential resistance of tomato cultigens to biovars I and III of *Pseudomonas solanacearum*. **Plant Disease**, v. 78, p. 1091-1094, 1994.

LOPES, C.A.; QUEZADO-SOARES, A.M.; BUSO, J.A.; MELO, P.E. Breeding for resistance to bacterial wilt of potatoes in Brazil. In: PRIOR, P.; ALLEN, C.; ELPHINSTONE, J.G. (Eds.). **Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects**. INRA Edition. Berlin, p. 290-293, 1998.

LOPES, C.A.; BOITEUX, L.S. Biovar-specific and broad spectrum sources of resistance to bacterial wilt in *Capsicum*. **Crop Breeding and applied biotechnology**, v. 4, p. 350-355, 2004.

LÓPES, M.M.; BERTOLINI, E.; CARUSO, P.; GORRIS, M.T.; CAMBRA, M.; BIOSCA, E.G. **Detección sensible y específica de *Ralstonia solanacearum*, incluso en forma viable pero no cultivable, por enriquecimiento-ELISA-DASI y PCR-cooperativa**. IV Congreso de Fitopatología. Maitencillo, Chile, 2003.

MACIEL. J.L.N.; DUARTE, V.; SILVEIRA, J.R.P. Frequencia de biovares de *Ralstonia solanacearum* em diferentes cultivares e épocas de cultivo de batata no Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 741-744, 2001.

MARTINS, O.M. **Polymerase chain reaction in the diagnosis of bacterial wilt, caused by *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.** Cuvillier Verlag, Göttingem, 2000. (PhD Thesis)

MELO, P.E. Cultivares de batata potencialmente úteis para processamento na forma de fritura no Brasil e manejo para obtenção de tubérculos adequados. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 20, p. 112-119, 1999.

MELO, P.E.; BUSO, J.A. Principais cultivares. In: LOPES, C.A.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultivo da batata**. Brasília: Embrapa Hortaliças – Instruções Técnicas, p. 3-8, 1997.



MILLER, J.T.; SPOONER, D.M. Introgression of *Solanum chacoense* (*Solanum* sect. *Petota*) upland populations reexamined. **Systematic Botany**, v. 21, p.1-15, 1996.

MIRANDA, E.F.O.; TAKATSU, A.; UESUGI, C.H. Colonização de raízes de plantas daninhas cultivadas *in vitro* e em vasos por *Ralstonia solanacearum*, biovars 1, 2 e 3. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p. 121-127, 2004.

NEHER, D. A.; REYNOLDS, K.L.; CAMPBELL, C. L. Analysis of disease progress curves using linear models. In: FRANCL, L. J.; NEHER, D. A. **Exercises in plant disease epidemiology**. St. Paul: APS, p. 29-33, 1997.

OEPP/EPPO. **Situation of *Ralstonia solanacearum* in the EPPO region** (latest update). EPPO REP. SERV. 97/111, 1997.

OLIVEIRA, A.M.R.; SILVEIRA, J.R.P.; DUARTE, V. Doenças bacterianas. In: PEREIRA, A.S.; DANIELS, J. (Eds.). **O cultivo da batata na região sul do Brasil**. Brasília, DF. Embrapa Informação Tecnológica, p. 277-299, 2003.

PALLERONI, N.J.; KUNISAWA, R.; CONTOPOULOU, R.; DOUDOROFF, M. Nucleic acids homologies in the genus *Pseudomonas*. **International Journal of Systematics Bacteriology**, v. 23, p. 333-339, 1973.

PEREIRA, A.S.; SOUZA, Z.S.; CHOER, E. Principais cultivares. In: PEREIRA, A.S.; DANIELS, J. (Eds.). **O cultivo da batata na região sul do Brasil**. Brasília, DF. Embrapa Informação Tecnológica, p. 143-153, 2003.

POUSSIER, S.; TRIGALET-DEMERY, D.; VANDEWALLE, P.; GOFFINET, B.; LUISETTI, J.; TRIGALET, A. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* as assessed by PCR-RFLP of the *hrp* gene region, AFLP and 16S rRNA sequence analysis, and identification of an African Subdivision. **Microbiology**, v. 146, p. 1679-1692, 2000.

PRIOR, P.; GRIMAUULT, V.; SCHMIT, J. Resistance to bacterial wilt (*Pseudomonas solanacearum*) in tomato: present status and prospects. In: HAYWARD, A.C. HARTMAN, G.L. (Eds.). **Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum***. Wallingford: CAB International, p. 209-223, 1994.

PRIOR, P.; STEVA, H.; CADET, P. Aggressiveness of strains of *Pseudomonas solanacearum* from the French West Indies. **Plant Disease**, v. 74, p. 962-965, 1990.

PRIOU, S.; ALEY, P.; GUTARRA, L. Assessment of resistance to bacterial wilt in CIP advanced potato clones. In: ALLEN, C.; PRIOR, P.; HAYWARD, A.C. (Eds.). **Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex**. St. Paul: APS, p. 261-267, 2005.

PRIOU, S.; GUTARRA, L.; ALEY, P. Highly sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in latently infected potato tubers by post-enrichment ELISA on nitrocellulose membrane. *EPPO/OWPP Bulletin*, 29, p. 117-125, 1999.

PRIOU, S.; SALAS, C.; MENDIBURU, F.; ALEY, P.; GUTARRA, L. Assessment of latent infection frequency in progeny tubers of advanced potato clones resistant to bacterial wilt: A new selection criterion. **Program report** 1999-2000, CIP, Lima, Peru, p. 105-116, 2000.

QUEZADO-SOARES, A. M.; LOPES, C. A.; BUSO, J. A.; MELO, P. Evaluation in Brazil of potato clones resistant to bacterial wilt in the Philippines. **Bacterial Wilt Newsletter** 14: 1-3. 1997.

REIFSCHNEIDER, F. J. B.; LOPES, C. A. Resistência de plantas a fitobactérias. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 30, 1997. Poços de Caldas. **Resumos...** Brasília, p. 41-46, 1997.

RIESEBERG, L.H.; WIDMER, A.; ARNTZ, A.M.; BURKE, J.J.M. The genetic architecture necessary for transgressive segregation is common in both natural and domesticated populations. **Philosophical Transactions: Biological Sciences**, v. 358, p. 1141-1147, 2003.

ROBERTS, D.P.; DENNY, T.P.; SCHELL, M.A. Cloning of the *egl* gene of *Pseudomonas solanacearum* and analysis of its role in phytopathogenicity. **J. Bacteriol.**, v. 170, 1445-1451, 1988.

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

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

SAILE, E.; Mc GARVEY, J.A.; SCHELL, M.A.; DENNY, T.P. Role of extracellular polysaccharide and endoglucanase in root invasion and colonization of tomato plants by *Ralstonia solanacearum*. **Phytopathology**, v. 87, p. 1264-1271, 1997.

SALANOUBAT, M.; GENIN, S.; ARTIGUENAVE, F.; GOUZY, J.; MANGENOT, S.; ARLAT, M.; BILLAULT, A.; BROTTIER, P.; CAMUS, J.C.; CATTOLICO, L.; CHANDLER, M.; CHOISNE, N.; CLAUDEL-RENARD, C.; CUNNAC, S.; DEMANGE, N.; GASPIN, C.; LAVIE, M.; MOISAN, A.; ROBERT, C.; SAURIN, W.; SCHIEX, T.; SIGUIER, P.; THÉBAULT, P.; WHALEN, M.; WINCKER P.; LEVY, M.; WEISSENBACH J.; BOUCHER C. A Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. **Nature**, v. 415, p. 497-502, 2002.

SCHAAD, N.W.; TAKATSU, A.; DIANESE, J.C. Serological identification of strains of *Pseudomonas solanacearum* in Brazil. In: **Proceedings of the fourth international conference on plant pathogenic bacterial**, France, p. 295-300, 1978.

SCHELL, M.A. Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia solanacearum* by an elaborate sensory network. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 38, p. 263-292, 2000.

SCHELL, M.A. Purification and characterization of an endoglucanase from *Pseudomonas solanacearum*. **Applied Environmental Microbiology**, v, 53, p. 2237-2241, 1987.

SCHELL, M.A.; ROBERTS, D.P.; DENNY, T.P. Analysis of the *Pseudomonas solanacearum* polygalacturonase encoded by pglA and its involvement in phytopathogenicity. **J. Bacteriol.**, v. 170, p. 4501-4508, 1988.

SCHMIEDICHE, P. Breeding potatoes for resistance to bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. In: PERSLEY, G.J. (Ed.). **ACIAR Proceedings...** Canberra, Australia, p. 105-111, 1985.

SEAL, S.E.; TAGHAVI, M.; FEGAN, N.; HAYWARD, A.C.; FEGAN, M. Determination of *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* rDNA subgroups by PCR tests. **Plant Pathology**, v. 48, p. 115-120, 1999.

SEQUEIRA, L. Epilogue: life with a mutable and treacherous tribe. In: HAYWARD, A.C.; HARTMAN, G.L. (Eds.) **Bacterial Wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum***. Wallingford: CAB International, p.235-247, 1994.

SHANER, G.; FINNEY, R.E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-wilting resistance in knox wheat. **Phytopathology**, v. 25. p. 1051-1056, 1977.

SILVEIRA, J. R. P. **Aspectos epidemiológicos e de resistência à *Ralstonia solanacearum* na cultura da batata no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: UFRGS, 2002, 104 p (Tese de Doutorado).

SMITH, E.F. A bacterial disease of tomato, pepper, eggplant and Irish potato (*Bacillus solanacearum* nov. sp.). United States Department of Agriculture, Division of Vegetable Physiology and Pathology. **Bulletin**, 12, p. 1-28, 1896.

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

TANS-KERSTEN, J.Ç. GUAN, Y.; ALLEN, C. *Ralstonia solanacearum* pectin methylesterase is required for growth on methylated pectin but not for bacterial wilt virulence. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, p. 4918-4923, 1998.

THURSTON, J.D.; LOZANO, J.C. Resistance to bacterial wilt of potatoes in Colombian clones of *Solanum phureja*. **American Potato Journal**, v. 45, n.2, p.51-55, 1968.

Timms-Wilson, T.M.; Bryant, K.; Bailey, M.J. Strain characterization and 16S-23S probe development for differentiating geographically dispersed isolates of the phytopathogen *Ralstonia solanacearum*. **Environ. Microbiol.**, v. 3, p. 785-797, 2001.

TRIGALET-DEMERY, D.; MONTROZIER, H.; ORGAMBIDE, G.; PATATRY, V.; ADAM, O.; NAVARRO, L.; COTELLE, V.; TRAGALET, A. Exopolysaccharides of *Pseudomonas solanacearum*: relation to virulence. In: International Bacterial Wilt Conference, 1992, Taiwan. **Proceedings...** Canberra: ACIAR, p. 312-315, 1993.

TUNG, P.X.; HERMSEN, J.G.TH.; ZAAG, P.V.; SCHMIEDICHE, P. Effects of heat tolerance on expression of resistance to *Pseudomonas solanacearum* E. F. Smith in potato. **Potato Research**, v. 35, p. 321-328, 1992.

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

TUNG, P.X.; RASCO JÚNIOR, E.T. Bacterial wilt resistance in potato populations with multiple sources of resistance and adaptation. **Bacterial Wilt Newsletter**, v.2, p. 3-5, 1987.

USDA – UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2. Southern Wilt of Geranium. **New Pest Response Guidelines**. USDA, APHIS, PPQ. Riverdale, MD. 2004.

VAN GIJSEGEM, F.; GENIN, S.; BOUCHER, C. Conservation of secretion pathways for pathogenicity determinants of plant and animal bacteria. **Trends microbial.**, v. 1, p. 175-180, 1993.

VASSE, J.; FREY, P.; TRIGALET, A. Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 8, p. 241-251, 1995.

VASSE, J.; GENIN, S.; FREY, P.; BOUCHER, C.; BRITO, B. The *hrpB* and *hrpG* regulatory genes of *Ralstonia solanacearum* are required for different stages of the tomato root infection process. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 13, p. 259-267, 2000.

WILLIAMSON, L.; NAKAHO, K.; HUDELSON, B.; ALLEN, C. *Ralstonia solanacearum* race 3, biovar 2 strains isolated from geranium are pathogenic on potato. **Plant Disease**, v. 86, p. 987-991, 2002.

WINSTEAD, N. N.; KELMAN, A. Inoculation techniques for evaluating resistance to *Pseudomonas solanacearum*. **Phytopatology**, v. 42, p. 628-634, 1952.

YABUUCHI, E.; Y. KOSAKO; H. OYAIZU; I. YANO; H. HOTTA; Y. HASHIMOTO; T. EZAKI; and M. ARAKAWA Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus with the types species *Burkholderia cepacea* (Palleroni and holmes 1981) comb. nov. **Microbiology and Immunology**, v.36, p.1251-1275, 1992.

YABUUCHI, E., KOSAKO, Y., YANO, I., HOTTA, H. & NISHIUCHI, Y. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: Proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. **Microbiology and Immunology**, v. 39, p. 897-904. 1995.

## **APÊNDICES**

APENDICE 1 - Acessos da coleção mundial de *Solanum chacoense* provenientes da Inter-Regional Potato Introduction Station, avaliados para resistência às biovaras 1 e 2 de *Ralstonia solanacearum*. Brasília-DF, 2004.

PI	WRF	SIDID
133073	317	133073 x 133664
133085	363	133085 x 133127
133123	266	133123 x 133656
133124	309	133124 x 133722
133608	3570	133608 x 537025
133618	311	133618 x 133663
133619	320	133619 x 133664
133656	269	133656 x 133659
133659	267	133123 x 133659
133662	1855	133662 x 133720
133708	362	189217 x 133708
133709	273	230580 x 133709
133710	368	133710 x 133127
133713	372	133713 x 133718
133722	389	230585 x 133722
133723	376	133722 x 133723
175401	889	175701 x 175446
175402	284	175402 x 197758
175415		EBS 43/8
175419		EBS 20/2 x 43/8
175443	286	175443 x 189221
189217		CPC 51B
189219	378	189219 x 189218
189220	285	175443 x 189220
189221		CPC 1459.2
195183	315	195183 x 133663
195184		CPC 1157
197758	296	197758 x 230581
197760		FCE 104
201846	1734	201846 x 230581
209411		BRU 57
209412		BRU 58
217451		SLU 3566
230580		SLE s.n.
230581	300	230581 x 189220
230582	304	230582 x 230864
230583		SLE s.n.
230585	388	230585 x 133709
230862	305	230862 x 230864
230863	303	230582 x 230863
265576		COR 707A
275136		HJT 349
275138		HJT 56
275139		HJT 297
275140	1567	275140 x 275137
275141		HJT 357
275142	1275	275142 x 602604
320281		HHR 3158
320282		HHR 3164
320283		HHR 3194
320284		HHR 3196
320285		HHR 3198
320286		HHRO 3297
320287		HHRO 3305
320288		HHRO 3327
320289		HHR 3432
320290		HHR 3629
320291		HHR 3633
320292		HHR 3700
320293		HHR 3706
320294		HHR 4039
414143		OKA 4822
414144		OKA 2955

PI	WRF	SIDID
414153		BOR s.n.
458308		HOF 1550
458309		HOF 1560
458310		OKA 4812
458311		OKA 4851
458312		OKA 4955
458313		OKA 4956
458314		OKA 4957
458315		OKA 5319
458316		OKA 6045
472809		HHR 3187
472810		HOF 1533
472811		OKA 4756
472812		OKA 4809
472813		OKA 4810
472816		OKA 4907
472817		OKA 4954
472818		OKA 5318
472819		OKA 5341
472820		OKA 5608
472821		OKA 5611
472822		OKA 5613
472823		OKA 5616
472824		OKA 5622
472825		OKA 5628
472826		OKA 5630
472827		GNZ 4
472828		OKA 6113
472829		OKA 6116
472830		OKA 6117
472831		OKA 6118
472832		OKA 6888
473402		WST s.n.
473403		HJT 6359
473404		HJT 6377
473405		HJT 6378
473406		HJT 6740
493298		HAW 537
498316		HOF 1554 x 1582
498317		HOF 1560 x 1561
498318		OKA 2823 x 2885
498319		OKA 2829 x 2839
498320		OKA 2838 x 2839
498321		HHR x OKA
498322		OKA 4951 x 4952
498323		OKA 5023 x 5024
498324		OKA 5317 x 5318
498325		OKA 7309
500020		OKA 7545
500042		OKA 7490
537025	3571	537025 x 133608
558042		OKA 7497
558043		OKA 7505
558044		OKA 7546
558232	3440	558232 x 558208
566738		BRU 021
566739		BRU 22
566740		HAW 3180
566742	3491	566742 x 566741
566743		OKA 53231 x 5323
566744		OKA 5327 x 5330
566745		OKA 5617
566746		ORHL 4826
568970		OCH 15263
568971		OCH 15264
568972		OCH 15265





Figura 1. Campo naturalmente infestado com a raça 1 de *Ralstonia solanacearum* utilizado para a seleção de genótipos de batata resistentes à murcha bacteriana. Embrapa Hortaliças, Brasília - DF, 2002.



Figura 2. Clonagem de progênies de batata obtidas de cruzamentos entre cultivares e clones resistentes da Embrapa Hortaliças. Brasília-DF, 2003.



Figura 3. Seleção para resistência à murcha bacteriana (biovars 1 e 3 de *Rasltonia solanacearum*) em acessos da coleção mundial de *Solanum chacoense*. Brasília-DF, 2004.

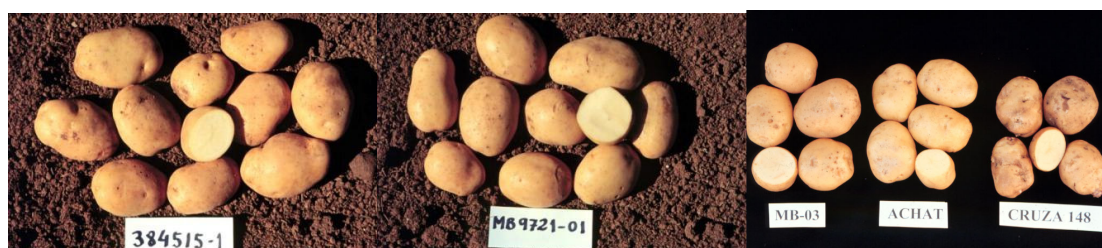


Figura 4. Cultivares e clones de batata (*Solanum tuberosum*) utilizados como padrões de resistência à murcha bacteriana nos diferentes experimentos na Embrapa Hortaliças. Brasília – DF, 2005.



Figura 5. Formatos observados na produção de tubérculos de batata (*Solanum tuberosum*) realizada na *Hayashi Batatas*. Clones com características agrônômicas favoráveis foram selecionados para verificação da resistência à murcha bacteriana. Cristalina – GO, 2003.

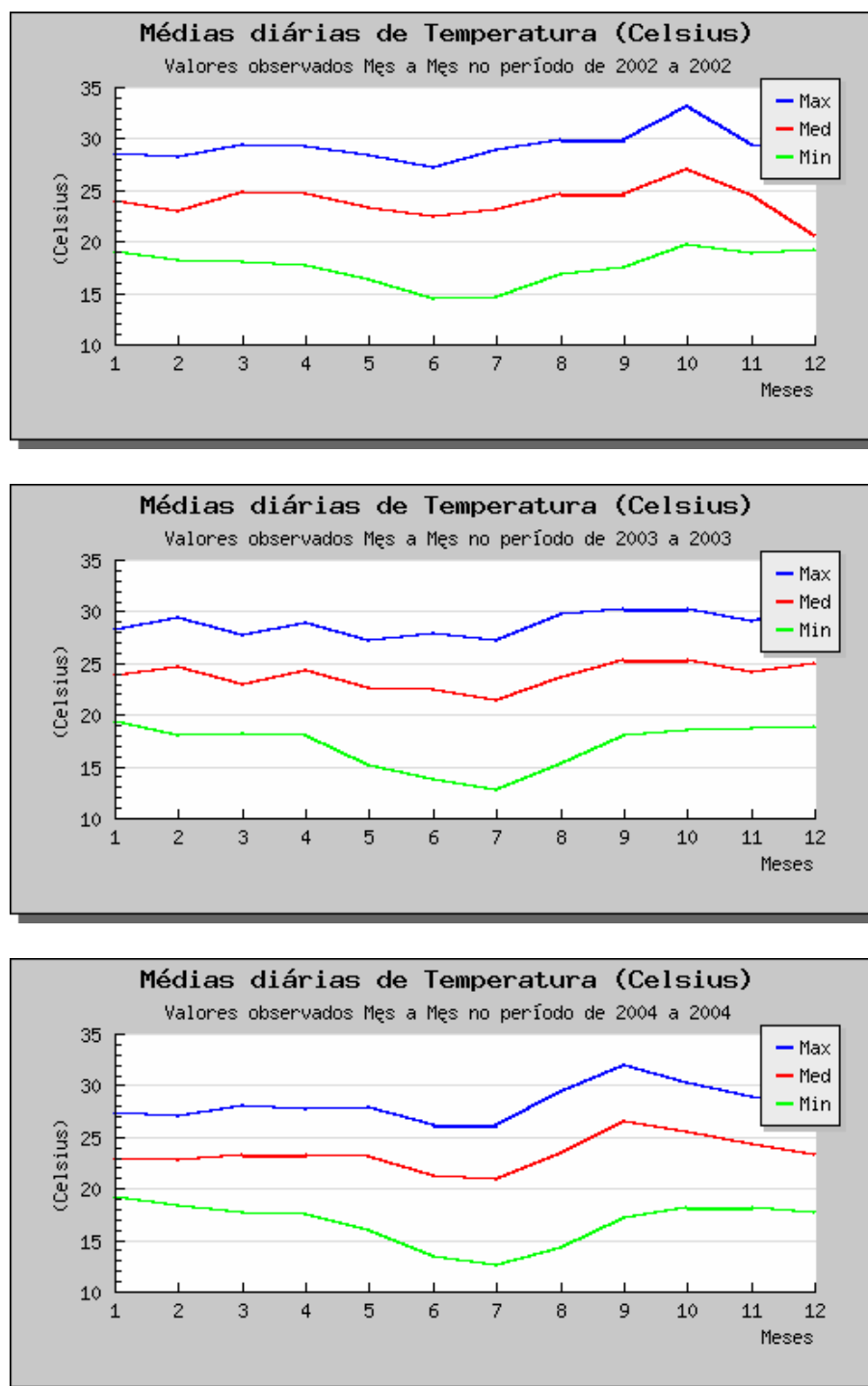


Figura 6. Valores de temperatura (°C) registrados na Embrapa Hortaliças entre 2002 e 2004, período utilizado na observação dos experimentos de campo. Brasília – DF.