

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CÂMPUS DE BOTUCATU**

**AVALIAÇÃO DA AGRESSIVIDADE E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA  
DE LINHAGENS DE *Ralstonia solanacearum* ISOLADAS DE  
DIFERENTES PLANTAS HOSPEDEIRAS**

**LUCAS MATEUS RIVERO RODRIGUES**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP – Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Proteção de Plantas).

**BOTUCATU-SP**

**MAIO – 2010**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CÂMPUS DE BOTUCATU**

**AVALIAÇÃO DA AGRESSIVIDADE E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA  
DE LINHAGENS DE *Ralstonia solanacearum* ISOLADAS DE  
DIFERENTES PLANTAS HOSPEDEIRAS**

**LUCAS MATEUS RIVERO RODRIGUES**  
**Engenheiro Agrônomo**

**Orientador: PROF. DR. ANTONIO CARLOS MARINGONI**  
**Co-Orientadora: PROFa. DRa. SUZETE APARECIDA LANZA DESTÉFANO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP – Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Proteção de Plantas).

**BOTUCATU-SP**  
**MAIO – 2010**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO -  
SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA  
- LAGEADO - BOTUCATU (SP)

R696a Rodrigues, Lucas Mateus Rivero, 1985-  
Avaliação da agressividade e caracterização genética de linhagens de  
*Ralstonia solanacearum* isoladas de diferentes plantas hospedeiras /. -  
Botucatu : [s.n.], 2010.  
vii, 68 f. : il., tabs., fots. color.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, 2010  
Orientador: Antonio Carlos Maringoni  
Co-orientador: Suzete Aparecida Lanza Destéfano  
Inclui bibliografia.

1. Murcha bacteriana. 2. rep-PCR. 3. PCR-RFLP. 4. Gene de *Endoglucanase*. 5. Gene *MutS*. I. Maringoni, Antonio Carlos. II. Destéfano, Suzete Aparecida Lanza. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônomicas. IV. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CAMPUS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: AVALIAÇÃO DA AGRESSIVIDADE E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA  
DE LINHAGENS DE *Ralstonia solanacearum* ISOLADAS DE DIFERENTES  
PLANTAS HOSPEDEIRAS

ALUNO: LUCAS MATEUS RIVERO RODRIGUES

ORIENTADOR: PROF. DR. ANTONIO CARLOS MARINGONI

CO-ORIENTADORA: PROFa DRa SUZETE APARECIDA LANZA DESTÉFANO

Aprovado pela Comissão Examinadora

  
\_\_\_\_\_  
PROF. DR. ANTONIO CARLOS MARINGONI

  
\_\_\_\_\_  
PROF. DR. VALDEMAR ATILIO MALÁVOLTA JUNIOR

  
\_\_\_\_\_  
PROF. DR. IVAN PAULO BEDENDO

Data da Realização: 28 de maio de 2010.

A meus pais Júlio e Sueli,

**DEDICO.**

## **Agradecimentos**

Ao **Prof. Dr. Antonio Carlos Maringoni**, pela orientação, paciência, amizade, confiança e todos os ensinamentos transmitidos durante todo o curso;

À **Profa. Dra. Suzete Aparecida Lanza Destéfano**, pela orientação nos experimentos de biologia molecular, amizade e oportunidade de realizar os estudos no Instituto Biológico de Campinas-SP;

À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrônômicas**, pela oportunidade da realização do curso de Mestrado;

Ao **Dr. Júlio Rodrigues Neto**, Curador da Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico, pelo fornecimento das culturas bacterianas utilizadas neste estudo, ajuda na condução dos experimentos, orientação, amizade e ensinamentos transmitidos nesse período;

À **CAPES** pela concessão da bolsa de estudos;

Ao **Dr. Márcio José da Silva** do Centro de Engenharia Genética e Biologia Molecular da Unicamp, pelo sequenciamento das linhagens utilizadas nesse estudo;

A **todos os professores e funcionários** do Departamento de Produção Vegetal - Defesa Fitossanitária pela colaboração e ensinamentos;

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas, **Adriana, Cristiane, Sandra e Tadeu**, pela colaboração nos estudos e amizade;

Aos Pesquisadores e colegas do Laboratório de Bacteriologia Vegetal do Instituto Biológico de Campinas-SP, **Dr. Luis Otávio S. Beriam** e **MSc. Irene Maria Gatti de Almeida, Talitha, Mariana, Denise, Daniela, Sônia, Daniele, Celeste e Renata** pela ajuda, incentivo e amizade;

A meus Irmãos **Tatiana e Renê** e a minha namorada **Mariara**, pelo incentivo e amizade;

A **todos que contribuíram** de alguma forma para a realização desta dissertação.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	v
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	vii
<b>RESUMO</b> .....	1
<b>SUMMARY</b> .....	3
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	5
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	8
<b>2.1. Murcha bacteriana de <i>Ralstonia solanacearum</i></b> .....	8
<b>2.2. Características da espécie e classificação de <i>Ralstonia solanacearum</i></b> .....	11
<b>2.3. Agressividade de <i>R. solanacearum</i> à plantas hospedeiras</b> .....	15
<b>2.4. Variabilidade genética de <i>Ralstonia solanacearum</i></b> .....	16
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	21
<b>3.1. Culturas bacterianas</b> .....	21
3.1.1. Reativação das culturas bacterianas.....	23
<b>3.2. Avaliação da agressividade de linhagens de <i>R. solanacearum</i> em plantas de tomate, fumo e batata</b> .....	24
<b>3.3. Teste de microbiolização <i>in vitro</i> em sementes de eucalipto</b> .....	25
<b>3.4. Caracterização molecular das linhagens de <i>R. solanacearum</i></b> .....	26
3.4.1. Extração do DNA genômico em pequena escala.....	26
3.4.2. Análise da diversidade genética por ERIC e BOX-PCR.....	26
3.4.2.1. ERIC-PCR.....	26
3.4.2.2. BOX-PCR.....	26
3.4.3. Análise de PCR-RFLP da região espaçadora 16S-23S DNAr.....	27

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
3.4.3.1. Condições de amplificação.....	27
3.4.4. Análise dos genes <i>Endoglucanase (Egl)</i> e <i>MutS</i> .....	28
3.4.4.1. Condições de amplificação.....	28
3.4.4.2. Sequenciamento dos produtos de PCR.....	29
3.4.4.3. Análise filogenética das sequências.....	29
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>30</b>
<b>4.1. Agressividade das linhagens de <i>R. solanacearum</i> à plantas de tomate, fumo e batata.....</b>	<b>30</b>
<b>4.2. Microbiolização <i>in vitro</i> em sementes de eucalipto.....</b>	<b>33</b>
<b>4.3. Diversidade genética dos isolados por BOX e ERIC-PCR.....</b>	<b>34</b>
4.3.1. BOX-PCR.....	35
4.3.2. ERIC-PCR.....	38
4.3.3. Análise por ERIC/BOX-PCR.....	42
<b>4.4. Análise da região espaçadora 16S-23S DNAr por PCR-RFLP.....</b>	<b>45</b>
<b>4.5. Análise filogenética pelos genes <i>Endoglucanase (Egl)</i> e <i>MutS</i>.....</b>	<b>46</b>
4.5.1. Análise gene <i>Endoglucanase (Egl)</i> .....	46
4.5.2. Análise gene <i>MutS</i> .....	48
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>54</b>
<b>6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>56</b>



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figuras</b>	<b>Página</b>
Figura 1. Aspecto das colônias de <i>R. solanacearum</i> em meio de cultura TZC.....	24
Figura 2. Crescimento observado no teste de microbiolização <i>in vitro</i> em sementes de eucalipto.....	33
Figura 3. Produtos da amplificação do DNA de linhagens de <i>R. solanacearum</i> utilizando-se o primer BOX A1R.....	37
Figura 4. Produto da amplificação do DNA de deferentes linhagens de <i>R. solanacearum</i> isoladas de <i>Eucalyptus</i> sp. por iniciador de BOX AR1.....	37
Figura 5. Dendograma gerado de acordo com os perfis de amplificação das 41 linhagens de <i>R. solanacearum</i> utilizando o iniciador BOX AR1, baseado no método UPGMA, utilizando coeficiente de similaridade Dice.....	38
Figura 6. Gel de agarose contendo produto da amplificação do DNA de linhagens de <i>R. solanacearum</i> por iniciadores de ERICR1 e ERIC 2.....	39
Figura 7. Gel de agarose contendo produto da amplificação do DNA de isolados de <i>R. solanacearum</i> por iniciadores de ERICR1 e ERIC 2, mostrando a diversidade entre algumas linhagens provenientes de <i>Eucalyptus</i> .....	40
Figura 8. Dendograma gerado de acordo com os perfis de amplificação das 41 linhagens de <i>R. solanacearum</i> utilizando os iniciadores ERIC1R e ERIC2, baseado no método UPGMA utilizando coeficiente de similaridade Dice.....	42

**LISTA DE FIGURAS**

	<b>Página</b>
Figura 9. Dendograma gerado de acordo com os perfis de amplificação das 41 linhagens de <i>R. solanacearum</i> utilizando os iniciadores BOX AR1 e ERIC1R e ERIC2, baseado no método UPGMA e coeficiente de similaridade Dice.....	44
Figura 10. Digestão dos produtos de amplificação da região espaçadora 16S-23S DNAr com as enzimas <i>Taq</i> I e <i>Hin6</i> I.....	45
Figura 11. Árvore filogenética baseada no sequenciamento de parte de gene de <i>endoglucanase</i> ( <i>Egl</i> ) das linhagens de <i>R. solanacearum</i> , utilizando-se <i>Neighbor-Joining</i> (NJ).....	47
Figura 12. Árvore filogenética baseada no sequenciamento de parte de gene de <i>MutS</i> das linhagens de <i>R. solanacearum</i> , utilizando-se <i>Neighbor-Joining</i> (NJ)...	49

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela</b>	<b>Página</b>
Tabela 1. Plantas hospedeiras ornamentais afetadas pela murcha bacteriana causada por <i>Ralstonia solanacearum</i> no Brasil.....	10
Tabela 2. Classificação Infra-Específica de <i>R. solanacearum</i> .....	13
Tabela 3. Determinação das biovars de <i>R. solanacearum</i> .....	13
Tabela 4. Diferenciação da biovar II.....	14
Tabela 5. Linhagens de <i>R. solanacearum</i> utilizadas neste estudo.....	21
Tabela 6. Sequência dos <i>primers</i> utilizados, nas reações de BOX e ERIC-PCR..	27
Tabela 7. Agressividade de linhagens de <i>R. solanacearum</i> avaliadas em plantas de batata cv. Ágata, tomate cv. Petomech VF e fumo var. Burley, através do Índice de Doença (%) calculado a partir da escala de notas adaptada de Morgado, Lopes & Takatsu (1992), utilizando a equação proposta por WINSTEAD & KELMAN (1952).....	32
Tabela 8. Influência da microbiolização <i>in vitro</i> em sementes de eucalipto com linhagens de <i>R. solanacearum</i> , de diferentes hospedeiras, avaliado através da porcentagem de plântulas saudáveis, germinação de sementes e colonização ou morte das plântulas.....	34
Tabela 9. Lista de linhagens utilizadas para classificação das linhagens estudadas de <i>R. solanacearum</i> em filotipos.....	51

## RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a agressividade de linhagens de *Ralstonia solanacearum* provenientes de solanáceas, plantas ornamentais e eucalipto, em plantas de batata, tomate e fumo, bem como caracterizar as linhagens por meio de técnicas moleculares. Vinte e duas linhagens foram utilizadas nos ensaios de avaliação da agressividade, em experimentos conduzidos em casa-de-vegetação evidenciaram alta severidade da doença pelas linhagens de *R. solanacearum* quando inoculadas em plantas de tomate e batata, sendo a batata mais afetada nas inoculações. Todas as linhagens mostraram-se agressivas, sendo que o fumo mostrou baixa suscetibilidade ao ataque das bactérias. As linhagens mais agressivas em plantas de tomate foram IBSBF 309, IBSBF 1712, IBSBF 1839, IBSBF 1882, IBSBF 1883 e IBSBF 2000, pertencentes às biovars I, II e III. As linhagens mais agressivas às plantas de fumo foram IBSBF 309, IBSBF 2131 e IBSBF 292<sup>T</sup>, pertencentes à biovar I. Foi efetuado também ensaio de microbiolização *in vitro* em sementes de eucalipto, a fim de se identificar possíveis linhagens patogênicas a esta espécie vegetal e concluiu-se que todas as linhagens utilizadas infectaram plantas de eucalipto ou afetaram seu crescimento. A caracterização molecular de 41 linhagens de *Ralstonia solanacearum*, provenientes de diversas plantas hospedeiras, incluindo solanáceas, bananeira, helicônia, plantas ornamentais e eucalipto, foi efetuada empregando-se ERIC e BOX-PCR e os resultados mostraram grande diversidade genética entre as linhagens. A análise de PCR-RFLP da região espaçadora 16S-23S DNAr

permitiu distinguir os isolados pertencentes à biovar III das demais biovars (I, II, IIA e IIT), quando digeridos com as enzimas *Taq* I e *Hin6* I. A análise de sequenciamento de parte dos genes *Endoglucanase (Egl)* e *MutS* possibilitou a classificação em filotipos e os resultados revelaram predominância do filotipo II no Brasil, sendo que quatro isolados foram classificadas como filotipo I, todos eles pertencentes à biovar III.

---

**Palavras-chave:** Murcha Bacteriana, rep-PCR, PCR-RFLP, gene de *Endoglucanase*, gene *MutS*.

AGRESSIVENESS EVALUATION AND GENETIC DIVERSITY OF STRAINS OF *Ralstonia solanacearum* ISOLATED FROM DIFFERENT HOST PLANTS. Botucatu, 2010. 68p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista

Author: Lucas Mateus Rivero Rodrigues

Adviser: Prof. Dr. Antonio Carlos Maringoni

Co- Adviser: Profa. Dra. Suzete Aparecida Lanza Destéfano

## SUMMARY

This study aimed to evaluate the aggressiveness of strains of *Ralstonia solanacearum* from solanaceus, ornamental and eucalyptus plants, on potato, tomato and tobacco, and to characterize the strains through molecular techniques. Twenty-two strains were used in this study to evaluate the aggressiveness and, the experiments conducted in a greenhouse revealed the high susceptibility of tomato and potato plants, with the potato being the most affected on through the inoculations. All isolates proved to be aggressive and higher tolerance to the attack of bacteria was verified on tobacco plants. Strains more aggressive on tomato were IBSBF 309, IBSBF 1712, IBSBF 1839, IBSBF 1882, IBSBF 1883 and IBSBF 2000, belonging to biovars I, II and III. The more aggressive strains on the tobacco plants were IBSBF 309, IBSBF 292<sup>T</sup> and IBSBF 2131 belonging to biovar I. Tests *in vitro* of microbiolization of eucalyptus seeds were also performed in order to identify possible pathogenic strains to this species and the results showed that all strains used cause infection on emerging plants or affected their growth. To molecular characterization of 41 strains of *Ralstonia solanacearum* from several host plants including solanaceous, banana, heliconia, ornamentals and eucalyptus were employed to ERIC and BOX-PCR, and the results showed high genetic diversity among strains. The analysis of PCR-RFLP of 16S-23S spacer region rDNA allowed us to distinguish the isolates belonging to biovar III from the others (biovars I, II, IIA and IIT) when digested with enzymes *Taq* I and *Hin6* I. The

sequence analysis of the partial of *Endoglucanase (Egl)* and *MutS* genes allowed the classification in phlotypes and the results revealed a predominance of the phlotype II in Brazil, and four isolates were classified in the phlotype I, all belonging to biovar III.

---

**Key-words:** Bacterial wilt, rep-PCR, PCR-RFLP, *Endoglucanase* gene, *MutS* gene.

## 1. INTRODUÇÃO

Causadora da murcha bacteriana em diferentes espécies vegetais, *Ralstonia solanacearum* [(SMITH, 1896) YABUUCHI et al., 1995] infecta as plantas de maneira vascular, que, na maioria das vezes evolui até a morte da planta, acarretando sérios prejuízos à diversas culturas de importância econômica, uma vez que inexistente um método de controle efetivo, e não há cultivares com resistência à grande diversidade desta espécie bacteriana (BUDDENHAGEN et al., 1964).

*R. solanacearum* já foi descrita em mais de 200 espécies de plantas pertencentes a aproximadamente 60 famílias botânicas, principalmente em plantas da família Solanaceae, envolvendo batata, tomate e fumo entre outras de grande importância econômica, sendo este patógeno um fator limitante para a produção em algumas culturas (HAYWARD, 1994). Atualmente, esta espécie bacteriana possui cinco raças (R), baseadas na patogenicidade a diferentes plantas hospedeiras, e, em cinco biovars (Bv), de acordo com a utilização de açúcares e álcoois hexoses. Esta bactéria ocorre em climas que variam do temperado ao tropical, com linhagens mais adaptadas ao clima frio, as quais foram determinadas por R3/BvII. Esta raça foi definida em 2002, como praga de alerta nacional pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, uma vez que é altamente agressiva à batata, de intenso cultivo para a produção de batata semente nos EUA, principalmente devido ao fato de que esta bactéria pode ser disseminada por meio de infecções latentes em plantas ornamentais, objeto de importação por aquele país (USDA, 2002).



Embora *R. solanacearum* R3/BvII tenha um número limitado de hospedeiras afetando principalmente a batata e, esporadicamente, tomate e berinjela, a BvII está listada entre os dez patógenos de plantas considerados como possíveis agentes de bioterrorismo. Desse modo, *R. solanacearum* R3/BvII é alvo de restrição quarentenária nos E. U. A., aparecendo na lista de proteção contra o bioterrorismo na agricultura do USDA (“United States Department of Agriculture”) (LAMBERT, 2002). Essa preocupação também está presente na Europa (EPPO, 2004), devido ao risco da bactéria se instalar em campos de produção de batata, uma vez que aquela biovar pode infectar e ser disseminada por meio de várias espécies de plantas ornamentais (WILLIAMSON et al., 2002; KIM et al., 2003; JANSE et al., 2004; SWANSON et al., 2005).

Atualmente, no Brasil, a murcha bacteriana vem causando grandes prejuízos também na eucaliptocultura, onde no período de abril a setembro de 2005, os danos causados por *R. solanacearum* em viveiros nos estados do Espírito Santo, Bahia, Maranhão, Minas Gerais e Pará resultaram no descarte de cerca de 550 mil minicepas, 6.800 mil propágulos e mais de 11 milhões de mudas, com prejuízo estimado em aproximadamente seis milhões de reais (ALFENAS et al., 2006).

Pouco se conhece a respeito da agressividade de linhagens de *R. solanacearum* oriundas de plantas ornamentais ou de eucalipto a outros hospedeiros, bem como da diversidade genética dessa bactéria no país. Estudos preliminares com inoculações cruzadas de linhagens de eucalipto e de tomateiro indicaram diferenças na patogenicidade àquelas hospedeiras (ALFENAS et al., 2006).

No caso de plantas ornamentais, a murcha bacteriana tem sido considerada uma doença emergente, representando grande potencial para a disseminação da bactéria, especialmente no caso da R3/BvII, onde inúmeras introduções têm sido detectadas principalmente nos E.U.A., em mudas de gerâneo oriundas da América Central e África (SWANSOM et al., 2005).

Além da classificação em raças e biovars, Fegan e Prior (2004) propuseram uma nova divisão, denominada de “filotipo”, com fundamento no estudo de seqüências da região espaçadora 16S-23S DNAr (ITS) e dos genes de *endoglucanase* e *MutS*. E assim *R. solanacearum* foram propostos quatro filotipos, que correspondem ao

provável local de origem das linhagens (FEGAN & PRIOR, 2004; PRIOR & FEGAN, 2005; 2006; CHAMPOISEAE & JONES, 2009).

A presente dissertação teve como objetivos avaliar a agressividade de linhagens de *R. solanacearum*, provenientes de diferentes plantas hospedeiras, em plantas de batata tomate e fumo, bem como avaliar o potencial de colonização das linhagens de *R. solanacearum* em plântulas de eucalipto por meio de microbiolização das sementes e caracterizar geneticamente as linhagens envolvidas neste estudo.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Murcha bacteriana de *Ralstonia solanacearum*

A murcha bacteriana causada por *R. solanacearum* [(SMITH, 1896) YABUUCHI et al., 1995] foi relatada pela primeira vez nos E.U.A., no final do século XIX em batata (*Solanum tuberosum* L.) e tomate (*Solanum lycopersicum* L.), (SMITH, 1896) e fumo (*Nicotiana tabacum* L.) (STEVENS & SACKETT, 1903). Posteriormente, a doença foi constatada em diversas partes do mundo em plantas de diversas famílias botânicas (KELMAN, 1953). O primeiro relato desta bacteriose no Brasil foi realizado por Von Parceval (1922), em plantas de fumo, no Estado do Rio Grande do Sul (TAKATSU & LOPES, 1997). Em plantas hospedeiras da família das solanáceas, principalmente batata e tomate, esta é a bacteriose mais importante, podendo inviabilizar a produção em áreas altamente infestadas. Por ser uma bactéria vascular, os sintomas dessa doença são reflexos da ação mecânica da obstrução dos vasos, ou por ação de metabólitos difundidos na seiva (MALAVOLTA JR. disponível em: <<http://www.feagri.unicamp.br/tomates/pdfs/doebacter.pdf>>). Os sintomas geralmente têm início com o escurecimento dos vasos condutores, amarelecimento e murcha de folíolos seguido de epinastia foliar, podendo recuperar seu porte normal nas horas com temperaturas mais amenas do dia. A evolução da doença ocorre rapidamente e de maneira

geral pode resultar na morte da planta afetada (MALAVOLTA JR. disponível em: <<http://www.feagri.unicamp.br/tomates/pdfs/doebacter.pdf>>; KIMATI, 2005).

A primeira ocorrência de murcha bacteriana na cultura do eucalipto em campo foi no município de Prata, Minas Gerais, relatada por Sudo et. al. (1983). Posteriormente, Dianese & Takatsu (1985) isolaram *R. solanacearum* de eucalipto no estado do Pará e Robbs et al. (1988) detectaram a presença desta bactéria na Bahia. Mais recentemente Auer et al. (2008) relataram a murcha bacteriana no Estado de Santa Catarina.

Nas plantas de eucalipto os sintomas iniciais são avermelhamento das folhas, redução do crescimento e murcha da planta aos três a quatro meses de idade (em condições naturais), os vasos de xilema ficam escurecidos, as hastes e ramos apresentam estrias marrom a marrom-escuras, podendo resultar na morte da planta. Em sintomas crônicos, ocorre a necrose das raízes e a planta morre após dois a seis meses da infecção (MAFIA, 2006)

Com relação à ocorrência da murcha bacteriana de *R. solanacearum* em plantas ornamentais no país, Gonçalves (1937), efetuou o primeiro registro dessa doença em plantas de dália (*Dahlia* sp.). Em nosso país a doença já foi descrita em 24 plantas hospedeiras ornamentais, incluindo espécies economicamente importantes como begônia, gerânio, crisântemo, helicônia entre outras (MALAVOLTA Jr. et al., 2008; ZOCCOLI, 2009), conforme citado na Tabela 1.

Tabela 1. Plantas hospedeiras ornamentais afetadas pela murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* no Brasil

Hospedeira	Nome Popular
<i>Begonia elatior</i>	Begônia
<i>Begonia</i> hib.	Begônia
<i>Chrysanthemum x morifolium</i>	Crisântemo
<i>Dahlia</i> sp.	Dália
<i>Dahlia x pinnata</i>	Dália
<i>Fuchsia</i> sp.	Brinco de Princesa, Lágrima, Agrado, Fúcsia
<i>Helianthus annanus</i>	Girassol ornamental
<i>Heliconia</i> sp.	Helicônia
<i>Heliconia bihai</i>	Helicônia
<i>Heliconia caribaea</i>	Helicônia
<i>Heliconia humilis</i>	Helicônia
<i>Heliconia x nickeriensis</i>	Helicônia
<i>Heliconia psittacorum</i>	Helicônia
<i>Heliconia x rauliniana</i>	Helicônia
<i>Heliconia stricta</i>	Helicônia
<i>Heliconia wagneriana</i>	Helicônia
<i>Kalanchoe tubiflora</i>	Kalanchoe, Coirana, Flor-da-Abissínia, Cacto da Abssínia
<i>Melanthera discoidea</i>	Melanthera
<i>Musa coccinea</i>	-
<i>Oxalis vulcanicola</i>	Oxális
<i>Pelargonium x hortorum</i>	Gerânio
<i>Pelargonium x zonale</i>	Gerânio
<i>Petunia x hybrida</i>	Petúnia
<i>Zinnia violacea</i>	Zínia

Outra doença economicamente importante causada por *R. solanacearum* é o Moko da bananeira, que foi relatada no Brasil pela primeira vez em São Paulo em 1933 por Mc Guirre, ocorrendo na baixada santista. Entretanto, este relato foi realizado apenas com base na observação de sintomas, e, provavelmente tratava-se de anomalia causada por fungo ou desordem nutricional, uma vez que a doença nunca foi comprovada em laboratório, sendo que somente em 1976, a doença foi oficialmente registrada, causando danos expressivos em bananeira da variedade Prata, no Amapá (Tokeshi & Duarte, 1976). A partir de 1987, vários focos da doença foram detectados nos Estados de Sergipe e Alagoas. Atualmente a murcha bacteriana vem sendo observada em toda região Norte, exceto no Acre (FREIRE et al., 2003).

Com relação ao controle dessa bacteriose, Takatsu & Lopes (1997) citam que o principal fator a ser considerado é o plantio em solo livre do patógeno, porém esta bactéria é nativa de solos brasileiros o que dificulta seu controle. Também é recomendado o plantio de material propagativo livre do patógeno, pois *R. solanacearum* é disseminada via plantas infectadas. Os mesmos autores preconizam a rotação de culturas com gramíneas. Entretanto, esse método não é recomendável para pequenos produtores, pela baixa rentabilidade e neste caso, indica-se o uso de hortaliças não hospedeiras de *R. solanacearum*. No caso do Moko da bananeira, aplicam-se medidas de controle por meio de legislação, ou seja, a erradicação e exclusão, uma vez que essa doença é objeto de restrição quarentenária, e, essas práticas vêm mantendo a doença sob controle (FREIRE et al., 2003).

## **2.2. Características da espécie e classificação de *Ralstonia solanacearum***

O gênero *Ralstonia* é pertencente à sub-divisão  $\beta$  do reino Proteobacteria, da classe *Neisseriae*, ordem *Burkholderiales* e da família *Burkholderiaceae*, composto atualmente por 14 espécies, sendo *R. syzygii* e *R. solanacearum* as espécies fitopatogênicas, causando doença em cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) e murcha bacteriana, respectivamente em grande número de espécies vegetais (YABUUCHI et al., 1995; SCHAAD, 2001; USDA, 2003; PRIOR & FEGAN, 2005). *R. solanacearum* já foi detectada no Brasil em mais de 80 espécies vegetais, sendo algumas delas de importância

econômica, como batata, tomate, fumo, banana, entre outros; (MALAVOLTA JR. et al., 2008).

*R. solanacearum* pertence ao grande grupo das bactérias Gram-negativas, em forma de bastonete medindo de 0,5 a 0,7  $\mu\text{m}$  x 1,5 a 2,5  $\mu\text{m}$ , possui um flagelo polar, é aeróbica estrita, oxidase e catalase positivos, acumula poli- $\beta$ -hidroxibutirato e reduz nitrato (BRADBURY, 1986; SCHAAD et al, 2001). Ainda segundo esses autores *R. solanacearum* não cresce a 40°C, apresenta pouco ou nenhum crescimento em nutriente líquido contendo 2% de NaCl e resultados negativos para os testes de arginina dihidrolase, liquefação de gelatina e hidrolise de esculina. Não produz pigmento fluorescente em meio B de King, porém em meios mais complexos produz pigmento de coloração marrom. Em meio TZC, as colônias podem ter aspecto mucóides ou fluidas, sendo que as fluidas são as virulentas (KELMAN, 1954).

A bactéria causadora da murcha foi denominada primeiramente como *Bacillus solanacearum* por Erwin F. Smith em 1896 e dezoito anos após sua descrição inicial, o autor a reclassificou para *Pseudomonas solanacearum* (KELMAN, 1953). Palleroni et. al. (1973), em estudo baseado na homologia de rRNA dividiu as pseudomonadas em cinco grupos, e *Pseudomonas solanacearum* ficou alocada no grupo II, sendo que essa espécie bacteriana foi transferida para o gênero *Burkholderia* por Yabuuchi et al. (1992). Em 1995, com a criação do gênero *Ralstonia* o agente causal da murcha bacteriana foi reclassificado como *Ralstonia solanacearum*, com base na análise filogenética da seqüência de nucleotídeos do gene 16S de DNAr da região, hibridização RNAr-DNA, análise de lipídeos celulares e ácidos (YABUUCHI et al., 1995).

Com relação à classificação infra-específica, esta espécie bacteriana possui cinco raças, com base na patogenicidade a diferentes plantas hospedeiras: raça 1, afetando solanáceas e eucalipto entre outras plantas hospedeiras de diversas famílias botânicas, sendo a mais amplamente distribuída em áreas de clima tropical do globo; raça 2, infectando bananeiras, helicônias e musáceas ornamentais em áreas de clima tropical causando a doença denominada Moko da bananeira, ocorrendo na América do Sul, Filipinas e Ásia; raça 3 afeta principalmente batata e também foi descrita em *Pelargonium* no Brasil e Estados Unidos da América, ocorre geralmente em altitude mais elevada, em

regiões com temperaturas amenas; raça 4 afetando o gengibre (*Zingiber officinale*), ocorrendo nas Filipinas; e a raça 5 afetando amoreira (*Morus alba*) na China, (BUDDENHAGEN et al., 1964; HAYWARD, 1964, 1991; HE et al., 1983), conforme a tabela Tabela 2.

Tabela 2. Classificação Infra-Específica de *R. solanacearum*

<b>Raça 1</b>	<b>Raça 2</b>	<b>Raça 3</b>	<b>Raça 4</b>	<b>Raça 5</b>
Biovar	Biovar	Biovar	Biovar	Biovar
I, III e IV	I, III e IV	II, IIA, IIN ou IIT	III e IV	V
Diversas hospedeiras, incluindo solanáceas e eucalipto	Banana, outras musáceas e helicônias	Batata e gerânio	Gengibre	Amoreira

Adaptado de Daughtrey (2003)

Além da classificação em raças, *R. solanacearum* pode ser distinguida em biovares. Esta classificação está fundamentada na utilização de açúcares e alcoóis hexoses. Hayward (1964) considerou assim, a existência de quatro biovares e, posteriormente, He et al. (1983) propuseram uma nova biovar (V), conforme Tabela 3.

Tabela 3. Determinação das biovares de *R. solanacearum*

<b>Testes</b>	<b><i>Ralstonia solanacearum</i></b>				
	<b>Biovar I</b>	<b>Biovar II</b>	<b>Biovar III</b>	<b>Biovar IV</b>	<b>Biovar V</b>
<b>Manitol</b>	-	-	+	+	+
<b>Sorbitol</b>	-	-	+	+	-
<b>Dulcitol</b>	-	-	+	+	-
<b>Trehalose</b>	+	-	+	+	+
<b>Lactose</b>	-	+	+	-	+
<b>Maltose</b>	-	+	+	-	+
<b>Celobiose</b>	-	+	+	-	+
<b>Gás em nitrato</b>	-	-	+	+	+

Adaptado de Schaad et al. (2001)



Em trabalhos desenvolvidos por Hayward et al. (1992), três linhagens isoladas de batata, sendo uma de origem de região de clima frio, (R3/BvII) e duas provenientes da região Amazônica (R1/BvI e R3/BvII), foram analisadas e quando comparadas bioquimicamente com outras linhagens de batata de diferentes localidades foram classificadas como BvII. Os autores demonstraram a existência de uma variante da BvII, posteriormente denominada de IIT, ou variante tropical (FRENCH, 1993) (Tabela 4).

Tabela 4. Diferenciação da biovar II

Testes	Biovar II	Biovar IIA	Biovar IIN ou T
Utilização de trealose	-	+	+
Utilização de inositol	+	-	+
Utilização de D-ribose	-	-	+
Atividade pectinolítica	baixa	alta	alta

Janse (2005)

O alto grau de diversidade em *R. solanacearum* pode ser explicado pela sua capacidade natural de troca de material genético por meio de transferência horizontal, durante o processo de infecção (BERTOLLA et al., 1999).

No Brasil, esta diversidade foi observada por Reifschneider & Takatsu (1985), que comprovaram a existência da BvI em todas as regiões brasileiras, diferentemente da BvII, encontrada apenas em regiões de clima ameno (Sul, Sudeste, e Centro-Oeste) e, da BvIII ocorrendo no norte e nordeste do país. Em outro estudo, Lopes (2005) verificou que as biovars I e II provenientes de batata estão disseminadas por todo o Brasil, devido a diversos fatores, entre eles a alta eficiência na disseminação da bactéria por meio de batata semente.

Além da classificação em raças e biovars, Fegan & Prior (2004) propuseram uma nova divisão, denominada de “filotipo”. Esta classificação foi baseada no estudo de seqüências da região espaçadora 16S-23S DNAr (ITS) e dos genes *Egl* e *MutS*. Assim, *R. solanacearum* ficou dividida em quatro filotipos: filotipo I: linhagens originárias da Ásia, incluindo linhagens das biovars III e IV; filotipo II: linhagens originárias da América, classificadas como BvI, II e IIT e raças 2 e 3; filotipo III: linhagens originárias da

África, biovars I e IIT; filotipo IV: linhagens originárias da Indonésia biovars I, II e IIT. Posteriormente, os filotipos foram subdivididos em sequevars, com base nas seqüências do gene de *endoglucanase* (FEGAN & PRIOR, 2004; PRIOR & FEGAN, 2005; 2006; CHAMPOISEAE & JONES, 2009).

### **2.3. Agressividade de *R. solanacearum* a plantas hospedeiras**

Segundo Champoiseae & Jones (2009), plantas de batata, tomate e outras solanáceas com resistência a *R. solanacearum* não mostram um controle efetivo da murcha bacteriana, devido às diferenças entre locais de plantio e diversidade das linhagens bacterianas presentes no solo.

Buddenhagen & Kelman (1964) ressaltaram que o grau de agressividade dessa espécie bacteriana pode estar relacionado pela diferença quantitativa em relação à produção de polissacarídeos extracelulares, entretanto este fato foi diferentemente relatado por Pun & Addy (1988), que concluíram não existir relação entre a agressividade e a produção de polissacarídeos extracelulares, embora os isolados mais agressivos tenham apresentado maior quantidade desses compostos.

Segundo Martins et al. (1988), para um programa de melhoramento vegetal visando resistência à murcha bacteriana, é necessário conhecer principalmente a distribuição geográfica e a agressividade do patógeno. Os mesmos autores estudaram a agressividade de 20 isolados de *R. solanacearum* BvI e III em três diferentes cultivares de tomate, em diferentes regimes de temperatura e detectaram uma grande variação na agressividade das linhagens avaliadas.

Morgado et al. (1992) pesquisaram a agressividade de 12 linhagens de *R. solanacearum* provenientes de berinjela, jiló, batata, pimentão e tomate a plantas de berinjela cultivares CNPH 110 e 175, suscetível e resistente, respectivamente, a murcha bacteriana. Os autores concluíram que oito linhagens foram altamente agressivas, três mediamente e uma pouco agressiva, não tendo sido observada correlação entre a agressividade, biovars ou hospedeiras. Resultados semelhantes foram observados por Silveira et al. (1998) que compararam a agressividade de 28 linhagens de *R. solanacearum*

BvI e III provenientes de plantas de tomateiro e verificaram que houve diferença da agressividade entre as linhagens, entretanto não houve diferença entre os biovares testados.

Coelho Netto et al. (2003) avaliaram a agressividade de 37 linhagens de *R. solanacearum* em mudas de tomate, pimentão e berinjela, sendo 23 pertencentes à BvI e 14 à BvIII. As avaliações da severidade da doença geraram valores da área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) e os autores concluíram que houve grande variação na agressividade das linhagens de ambas as biovares, sendo que as plantas de pimentão e de berinjela foram menos afetadas do que as plantas de tomate.

Em estudo realizado por Ji et al. (2007), 15 linhagens de *R. solanacearum*, provenientes de pimentão e plantas ornamentais do Estado da Flórida (E.U.A.) e 12 linhagens de outras localidades e hospedeiras foram inoculadas em plantas de tomate e fumo, e os resultados indicaram que todas as linhagens utilizadas foram mais agressivas ao de tomateiro do que em fumo, ocorrendo ainda grande variação da agressividade nas plantas de fumo.

#### **2.4. Variabilidade genética de *Ralstonia solanacearum***

A alta variabilidade genética de *R. solanacearum* está relacionada a inúmeros fatores como gama de hospedeiros, distribuição geográfica, agressividade, propriedades fisiológicas, adaptação a diferentes temperaturas e, até, disseminação por meio de insetos (COSTA et al, 2007). Ainda, a diversidade genética desta complexa espécie bacteriana tem sido demonstrada pela alta variabilidade morfológica (tipos de colônias), fenotípica (biovares) e patogênica (raças) (BOUCHER et al., 2006).

Opina et al. (1997) desenvolveram *primers* específicos, denominados 759 e 760, para a identificação de *R. solanacearum*, amplificando um fragmento de 282 pb. Este par de *primers* foi considerado como potencial para rápida diferenciação e identificação de *R. solanacearum*, em relação a *R. syzygii* e BDB (“Banana Disease Bacteria” ou “Banana Blood Disease”). Villa et al. (2003) utilizaram este par de *primers* para analisar, através do sequenciamento e hibridização, 57 isolados do gênero *Ralstonia*, provenientes de diversos locais, sendo 49 linhagens de *R. solanacearum*, seis

linhagens de *R. syzygii* e duas linhagens da doença denominada de BDB. Os resultados permitiram a caracterização de em 3 grupos distintos: grupo 1: linhagens de *R. solanacearum* classificadas como biovars III, IV, V e IIN provenientes do Japão; grupo 2: composto por *R. solanacearum* biovars I, II e IIN oriundos do Brasil; grupo 3: *R. solanacearum* BvIIN isolados no Japão e Filipinas. As linhagens de *R. syzygii* e de “Banana Blood Disease” foram alocados no grupo 3. No mesmo trabalho, os autores efetuaram estudo de padrões de restrição e verificaram a formação de três grupos quando utilizada a enzima *Nla I*. O primeiro grupo formado por linhagens das BvsIII e IV; o segundo por linhagens BvsI e II; e o terceiro contendo apenas uma linhagem classificada como BvII, sendo que outras enzimas possibilitaram distinguir as espécies *R. solanacearum* e *R. syzygii*.

A diversidade genética de *R. solanacearum* também foi avaliada por meio da metodologia de AFLP, por Yu et al. (2003). Os autores analisaram 83 linhagens isoladas de gengibre no Hawaii e de outras diferentes plantas hospedeiras provenientes de diversos locais, tendo sido verificada alta similaridade entre as linhagens de gengibre e baixa similaridade entre aqueles de outras linhagens.

Gillings & Fahy (1993), estudaram a diversidade genética de 53 isolados de *R. solanacearum*, biovars II e IIN, obtidos de diversos hospedeiros e localidades. Estas biovars foram claramente separadas por meio da digestão do DNA genômico total com enzima *Hae III*.

Poussier et al. (1999) avaliaram a diversidade genética de *R. solanacearum* por meio da técnica de PCR-RFLP do gene *hrp* de linhagens da África, Ásia, Américas do Norte, Central e do Sul, Europa e Oceania, num total de 120 isolados. Também incluíram na pesquisa isolados de *R. pickettii*, *R. eutropha*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas* spp., *Xanthomonas* spp. *Erwinia chrysanthemi* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Utilizando 13 enzimas de restrição, as 120 linhagens estudadas foram separadas em 15 “clusters” e “sub-clusters” (I a VIII), confirmando a grande variabilidade de *R. solanacearum*, principalmente da BvI.

Esta mesma técnica foi utilizada por Poussier et al. (2000) para avaliar a diversidade entre 181 linhagens de *R. solanacearum* provenientes de várias

plantas hospedeiras, oriundas de diversas regiões do globo. Os resultados obtidos mostraram que a formação de clusters estava de acordo com a classificação em biovar e com o local de origem das linhagens. Nesse mesmo estudo, a técnica de AFLP permitiu confirmar os resultados de PCR-RFLP.

Baseado nessa mesma técnica, Fouché-Weich et al. (2006) analisaram as linhagens de *R. solanacearum* oriundos de eucalipto (BvI) e batata (BvII) provenientes da África e uma linhagem de tomate (BvIII). As linhagens das biovars I e III puderam ser separadas das linhagens BvII, confirmando os resultados obtidos pela técnica de AFLP.

Uma outra técnica empregada para avaliação da diversidade de *R. solanacearum* está baseada no estudo de seqüências repetitivas do genoma. Smith et al. (1995) avaliaram a variabilidade genética de 45 linhagens classificadas como BvII e uma da BvIIN, oriundas do Quênia, além de linhagens de referência de outros países, por meio da técnica rep-PCR. Os resultados obtidos possibilitaram distinguir 10 grupos de *R. solanacearum* entre as linhagens provenientes do Quênia e 27 outros grupos, que incluíram as linhagens de outros países. Nesse mesmo estudo, a utilização da técnica de rep-PCR e “Pulsed Field” permitiram a clara distinção da R3/BvIIN das demais linhagens.

Horita & Tsuchiya (2001) analisaram por meio de rep-PCR, 78 linhagens de *R. solanacearum* de diversas hospedeiras, classificadas em seis diferentes biovars, provenientes do Japão e de outros países. Estes autores separaram as linhagens em dois grupos, onde o primeiro abrigou as linhagens classificadas como BvIII, IV e V, linhagens BvI provenientes da Ilhas Reunião e um isolado BvIIN do Japão. O segundo grupo constituído pelas linhagens classificadas como BvI, II e IIN, ocorrendo alta similaridade entre os isolados BvIIN provenientes do Brasil e Japão.

Utilizando REP-PCR para análise de 19 linhagens de *R. solanacearum*, Martins & Rudolph (2002) identificaram três grupos com similaridade maior que 50%. O primeiro grupo formado por apenas uma linhagem da Austrália; o segundo grupo que mostrou-se mais diversificado com três subgrupos, formado por linhagens de várias localidades, como Quênia, Camarões, Guiana, Costa Rica e Indonésia, bem como linhagens classificadas em biovars e raças diferentes; o terceiro grupo ficou

composto apenas por linhagens isoladas de batata e tomate e uma de plátano, oriundas do Brasil e Peru.

Silveira et al. (2005) avaliaram a diversidade genética de 50 linhagens provenientes de batata no estado do Rio Grande do Sul por rep-PCR e RAPD, conseguindo separar claramente as biovars I e II, por ERIC e BOX-PCR, porém não foi possível identificar variabilidade entre as linhagens da BvII. Com a metodologia de RAPD também foi possível a diferenciação das biovars I e II e, ainda, a separação das linhagens por região geográfica da qual foram obtidos.

Costa et al. (2007) avaliando a diversidade genética de 70 linhagens provenientes de tomateiro e outras plantas provenientes da região amazônica, por comparação utilizando BOX-PCR, verificaram alto grau de polimorfismo entre as linhagens estudadas, separando-as em cinco grupos, não havendo entretanto, relação com hospedeiro, biovar ou local de coleta, sendo possível separar apenas a BvIIN das biovars I e III.

Fegan & Prior (2006) estudaram a diversidade genética de linhagens de *R. solanacearum* capazes de causar murcha em plantas de bananeira, através da classificação filotípica das linhagens utilizando amplificação e sequenciamento de parte do gene *endoglucanase*. Nesse estudo foram utilizados cinco isolados associados à “Banana Blood Disease”, três de *R. syzygii* e 44 de *R. solanacearum* de localidades variadas. Todos os isolados causadores do “Moko” foram classificados como filotipo II, que foram separados em 4 clusters distintos.

Além da agressividade Ji et al. (2007), também estudaram a diversidade genética com base na análise filogenética de sequências de parte do gene de *endoglucanase* em linhagens de *R. solanacearum*, obtidas de plantas ornamentais, pimentão e outras hospedeiras, verificando a ocorrência de linhagens classificadas como filotipo I, sequevar 13 e filotipo II.

Já Perez et al. (2008) estudaram a diversidade genética de 55 linhagens de *R. solanacearum* isoladas de diversas culturas na Guatemala, através de caracterização bioquímica e filotipagem das linhagens. Neste caso, foi demonstrada a presença de três grupos distintos no país, com linhagens pertencente ao filotipo I sequevar

14, linhagens do filotipo II sequevar 6 isoladas de bananeira e filotipo II sequevar 1 (R3/BvII).

Recentemente, a diversidade genética de 40 linhagens de *Ralstonia solanacearum* provenientes de batata da América do Sul e de outras localidades foi estudada por Nouri et al. (2009), pela metodologia de rep-PCR. Os autores conseguiram separar as linhagens em dois grupos, o primeiro alocou 37 das 40 linhagens testadas e o segundo contendo três linhagens provenientes do Irã, classificadas como BvIIT. Com esse estudo, os autores concluíram o primeiro relato de *R. solanacearum* BvIIT, filotipo II fora da América do Sul.

Ainda, Xu et al. (2009) pesquisaram a diversidade genética em 286 linhagens de *R. solanacearum* isolados de 17 espécies de plantas na China, utilizando seqüência de parte dos genes *Egl* e *hrpB*. Os resultados indicaram a existência dos filotipos I contendo linhagens das BvsIII, IV e V e II, contendo linhagens das BvsI e II.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Culturas bacterianas

As 41 linhagens de *Ralstonia solanacearum* procedentes de diferentes plantas hospedeiras e regiões geográficas utilizadas neste trabalho foram obtidas na Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico (IBSBF), Campinas-SP (Tabela 3).

Tabela 5. Linhagens de *R. solanacearum* utilizadas neste estudo

IBSBF	Hospedeiro	Biovar	Raça	Procedência
33 <sup>a</sup>	<i>Solanum lycopersicum</i>	I	1	Elias Fausto - SP
59 <sup>a</sup>	<i>Solanum tuberosum</i>	II A	3	Capão Bonito - SP
134	<i>Solanum tuberosum</i>	II	3	Itutinga - MG
188	<i>Musa</i> sp.	I	2	Humaitá - AM
309 <sup>a</sup>	<i>Nicotiana tabacum</i>	I	1	Vale do Itajaí - SC
623 <sup>a</sup>	<i>Eucalyptus urophylla</i>	I	1	Jarí - PA
624 <sup>a</sup>	<i>Eucalyptus urophylla</i>	II T	3	Tucuruí - PA
625 <sup>a</sup>	<i>Eucalyptus urophylla</i>	I	1	Esplanada - BA

Continua...



Tabela 5. Continuação

<b>638<sup>a</sup></b>	<i>Eucalyptus urophylla</i>	I	1	Jarí - PA
<b>1148<sup>a</sup></b>	<i>Marsypianthes chamedris</i>	I	1	Planaltina - DF
<b>1543</b>	<i>Musa</i> sp.	I	2	Itacoara - AM
<b>1545<sup>a</sup></b>	<i>Melanthera discoidea</i>	I	1	Coari - AM
<b>1546<sup>a</sup></b>	<i>Fuchsia</i> sp.	I	1	Registro – SP
<b>1548<sup>a</sup></b>	<i>Oxalis</i> sp.	I	1	São Paulo – SP
<b>1560</b>	<i>Solanum melongena</i>	I	1	Benjamim Constant - AM
<b>1561</b>	<i>Solanum jilo</i>	I	1	São Gabriel da Cachoeira - AM
<b>1708</b>	<i>Pelargonium x hortorum</i>	II	3	Vargem Grande Paulista - SP
<b>1711</b>	<i>Pelargonium x hortorum</i>	II	3	Vargem Grande Paulista - SP
<b>1712<sup>a</sup></b>	<i>Pelargonium x hortorum</i>	II	3	Vargem Grande Paulista - SP
<b>1839<sup>a</sup></b>	<i>Begonia</i> hib.	III	1	Holambra – SP
<b>1882<sup>a</sup></b>	<i>Begonia</i> hib.	III	1	Atibaia – SP
<b>1883</b>	<i>Begonia</i> hib.	III	1	Atibaia – SP
<b>2000<sup>a</sup></b>	<i>Solanum lycopersicum</i>	III	1	Manaus – AM
<b>2131<sup>a</sup></b>	<i>Eucalyptus urophylla</i>	I	1	Carbonita - MG
<b>2132</b>	<i>Eucalyptus urophylla</i>	I	1	Carbonita - MG
<b>2133</b>	<i>Eucalyptus urophylla</i>	I	1	Carbonita - MG
<b>2518<sup>a</sup></b>	<i>Tagetes</i> sp.	I	1	Planaltina – DF
<b>2525<sup>a</sup></b>	<i>Eucalyptus urophylla</i>	I	1	Eunápolis - BA
<b>2526</b>	<i>Eucalyptus urophylla</i>	I	1	Eunápolis - BA
<b>2548<sup>a</sup></b>	<i>Eucalyptus urophylla</i>	I	1	Pará
<b>2568<sup>a</sup></b>	<i>Eucalyptus</i> sp.	I	1	S. Fco. do Sul - SC
<b>2569</b>	<i>Musa</i> sp.	I	2	Japoatã - SE

Continua...

Tabela 5. Continuação

2570	<i>Musa</i> sp.	I	2	Japoatã – SE
2571	<i>Musa</i> sp.	I	2	Japoatã – SE
2572	<i>Musa</i> sp.	I	2	Japoatã – SE
2574	<i>Musa</i> sp.	I	2	Japoatã – SE
2575	<i>Musa</i> sp.	I	2	Japoatã - SE
2644	<i>Heliconia</i> sp.	I	2	Abreu e Lima - PE
2576	<i>Eucalyptus</i> sp.	I	1	S. Francisco do Sul - SC
2577 <sup>a</sup>	<i>Eucalyptus</i> sp.	I	1	S. Francisco do Sul - SC
292 <sup>T, a</sup>	<i>Solanum lycopersicum</i>	I	1	E.U.A

IBSBF = Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico, Campinas, SP.

<sup>T</sup> = linhagem tipo da espécie

<sup>a</sup> = linhagens utilizadas nos testes de agressividade

### 3.1.1. Reativação das culturas bacterianas

As ampolas de vidro contendo as culturas bacterianas liofilizadas foram abertas com assepsia e aproximadamente 100 µL de água destilada esterilizada foram depositados no interior de cada ampola. Após cerca de 30 minutos, uma alíquota de 30 µL da suspensão foi semeada em placas de Petri contendo meio de cultura TZC (0,1% de caseína hidrolisada, 1% de peptona, 0,5% de glucose e 0,05% de cloreto de trifetil tetrazólio v/v) (KELMAN, 1954), e incubada a 28 °C, por 24 a 48 horas. Para as linhagens preservadas a -80 °C, alíquotas de aproximadamente 10 µL das culturas bacterianas foram semeadas em meio de cultura TZC, e incubadas por 24 a 48 horas a 28 °C. Após o crescimento das linhagens, foi realizada a seleção de colônias virulentas, ou seja, àquelas de aspecto fluido, de coloração branca a róseo (Figura 1), as quais foram transferidas posteriormente para meio de cultura Nutriente Ágar (contendo 0,5% de peptona, 0,3% de extrato de carne e 0,1% de NaCl), multiplicando, assim, as colônias de interesse.



Figura 1. Aspecto das colônias de *R. solanacearum* em meio de cultura TZC, à esquerda detalhe da colônia virulenta e a direita colônia não virulenta.

Para os ensaios e repicagens de rotina, as culturas bacterianas foram mantidas em tubos de ensaio contendo água destilada esterilizada, sob a forma de suspensão (RODRIGUES et al., 2009).

### 3.2. Avaliação da agressividade de linhagens de *R. solanacearum* em plantas de tomate, fumo e batata

Para os testes de agressividade, foram selecionadas 22 linhagens de *R. solanacearum* (assinaladas com <sup>a</sup> na Tabela 3), sendo 16 delas pertencentes à BvI, três da BvII e três pertencentes a BvIII. Essas linhagens foram testadas em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) cv. Petomech VF, fumo (*Nicotiana tabacum* L.) var. Burley e batata (*Solanum tuberosum* L.) cv. Ágata, provenientes de mini-tubérculos.

As plantas foram inoculadas quando apresentavam 8 folhas definitivas, expandidas. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso, com quatro repetições, constituídas de uma planta por linhagem. As inoculações foram realizadas por meio de ferimento na axila da terceira folha com auxílio de um alfinete, onde previamente foram depositados 30µL da suspensão bacteriana, padronizadas em espectrofotômetro a 0,1 de absorbância (~600nm), resultando na concentração aproximada de 10<sup>8</sup> UFC/mL (WILLIAMSON et al., 2002).

A agressividade das linhagens foi estudada por meio de avaliações efetuadas aos 6, 13, 20 e 27 dias após a inoculação (DAI), atribuindo-se notas variando de 0 a 5, sendo: 0 = plantas saudias; 1= plantas com uma folha murcha; 2 = plantas com 2 folhas murchas; 3 = plantas com 3 folhas murchas; 4 = plantas com todas as folhas murchas, exceto as do ápice; 5 = plantas com todas as folhas murchas ou mortas (adaptado de MORGADO et al., 1992).

O índice de doença (ID) foi calculado por meio da fórmula proposta por Winstead & Kelman (1952):  $ID = [\sum(N_i \times i)] / (N \times 5)$ , onde  $N_i$ = número de plantas em cada classe de sintoma;  $i$ = nota atribuída as plantas (0 a 5);  $N$ = número total de plantas inoculadas, multiplicada por 5, nota máxima da escala.

Os ensaios foram conduzidos em casa-de-vegetação no Instituto Biológico, nas dependências do Laboratório de Bacteriologia Vegetal (IB/APTA), em Campinas-SP, entre os meses de novembro de 2008 e abril de 2009.

### **3.3. Teste *in vitro* de microbiolização em sementes de eucalipto**

O teste de microbiolização *in vitro* foi realizado a fim de se identificar possíveis linhagens patogênicas também ao eucalipto (*Eucalyptus* sp.). A metodologia utilizada foi adaptada de Bringuel et al. (2001) e Mafia (2006), utilizando-se sementes de *E. grandis* e as linhagens empregadas foram as mesmas inoculadas nas plantas de tomate, batata e fumo. A desinfestação superficial das sementes de eucalipto foi efetuada por imersão em álcool 70% (30 s), seguida da imersão em solução de hipoclorito de sódio 1% (3 min) e lavagem em água destilada esterilizada por duas vezes consecutivas. A seguir as sementes foram imersas em suspensão bacteriana na concentração de  $10^8$  UFC/mL por 24 horas a 28 °C, com exceção das sementes testemunhas que foram mantidas nas mesmas condições, porém em água destilada e esterilizada. Após esse período, as sementes foram depositadas individualmente em tubos tipo “Falcon” (25 mL) contendo quatro mL de meio agar-água (0,85%). Os tubos foram mantidos em temperatura ambiente e após 30 dias avaliou-se a germinação das sementes ou morte das plântulas de eucalipto. Foram utilizadas 13 repetições para cada linhagem.

### 3.4. Caracterização molecular das linhagens de *R. solanacearum*

#### 3.4.1. Extração do DNA genômico em pequena escala

A extração de DNA genômico em pequena escala das linhagens de *R. solanacearum* foi realizada seguindo-se a metodologia descrita por Pitcher et al. (1989). A concentração e integridade dos DNAs obtidos foram avaliadas por meio de eletroforese em gel de agarose 0,6% corado com brometo de etídio (10 mg/mL).

#### 3.4.2. Análise da diversidade genética por ERIC e BOX-PCR

Foram utilizados aproximadamente 150 ng de DNA de cada amostra em reações nos experimentos de diversidade genética por ERIC-PCR e BOX-PCR com volume final de 25 µL. Os protocolos de amplificação para os diferentes *primers* foram:

**3.4.2.1. ERIC-PCR:** 2,5U de enzima *Taq* polimerase Fermentas por reação, 1X tampão de reação da enzima contendo KCl 50mM, 0,2 mM de dNTPs, 0,8 µM de cada *primer* e 3,0 mM MgCl<sub>2</sub>. O programa de amplificação das amostras consistiu de um ciclo de denaturação inicial a 95 °C/7 min.; seguido de 30 ciclos a 94 °C/1 min; 53 °C/1 min e 65 °C/8 min; e um ciclo de extensão final a 65 °C/16 min.

**3.4.2.2. BOX-PCR:** 2,5 U de enzima *Taq* polimerase Fermentas por reação, 1X tampão de reação da enzima, 0,2 mM de dNTPs, 0,5 µM do *primer* e 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>. O programa de amplificação das amostras consistiu de um ciclo de denaturação inicial a 95 °C/7 min; seguido de 30 ciclos a 94 °C/1 min; 52 °C/1 min e 65 °C/8 min; e um ciclo de extensão final a 65 °C/15 min.

Após amplificação, os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1,5%), tampão TAE 1X e corado com brometo de etídio (10 mg/mL). Os

géis foram expostos à luz ultravioleta e os resultados foto-documentados em sistema digital Alpha Image 2200.

As seqüências dos *primers* utilizados estão descritas na Tabela 6.

Tabela 6. Seqüência dos *primers* utilizados, nas reações de BOX e ERIC-PCR

<b>Código</b>	<b>Seqüência do <i>primer</i> (5' → 3')</b>	<b>No. nucleot.</b>	<b>Especificidade</b>
<b>ERIC1R</b>	ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C	22	<i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus sequence</i>
<b>ERIC2</b>	AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G	22	<i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus sequence</i>
<b>BOX A1R</b>	CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G	22	Elementos Box

Para análise dos resultados foi construída uma matriz codificada em 0 ou 1, para ausência ou presença de bandas, respectivamente, possibilitando a obtenção dos dendogramas de similaridade, que foram gerados com a utilização do algoritmo UPGMA no programa NTSYS-PC (RUHLF, 1992), empregando o coeficiente de similaridade de Dice.

### 3.4.3. Análise de PCR-RFLP da região espaçadora 16S-23S DNAr

#### 3.4.3.1. Condições de amplificação

As reações de amplificação foram realizadas utilizando-se aproximadamente 200 ng de DNA num volume final de 25 µL, contendo 2U enzima *Taq* polimerase (Fermentas), 1X tampão de reação da enzima contendo KCl 50mM, 1X BSA, 0,2 mM dNTPs, 0,4 µM de cada *primer* e 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>. O programa de amplificação das amostras consistiu de um ciclo de denaturação inicial a 95 °C/2 min; seguido de 30 ciclos a 94 °C/1 min; 60 °C/1 min e 72 °C/3 min; e um ciclo de extensão final a 72 °C/5 min. Os *primers* empregados para amplificação do fragmento esperado de 1000 pares de bases (pb)

foram: pHr (5' TGC GGC TGG ATC ACC TCC TT 3') (MASSOL-DEYA et al., 1995) e p322-anti (5' GGT TCT TTT CAC CTT TCC CTC 3') (HONEYCUTT et al., 1995).

Cerca de 5 µL de produtos de amplificação obtidos foram digeridos com enzimas de restrição *Alu* I, *Hinf* I, *Bsp*143 I, *Bsu*R I *Hpy*F3 I, *Msp* I, *Rsa* I, *Hin*6 I ou *Taq* I, de acordo com as recomendações do fabricante, em volume total de reação de 15 µL. Os perfis de restrição obtidos foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose 3%, corado com brometo de etídio (10 mg/mL) e fotodocumentado em sistema digital Alpha Image 2200.

#### 3.4.4. Análise dos genes *Endoglucanase (Egl)* e *MutS*

##### 3.4.4.1. Condições de amplificação

Para as reações de amplificação de parte dos genes *Egl* e *MutS* foram utilizados aproximadamente 100 ng de DNA de cada linhagem, num volume final de 25 µL. Os protocolos de amplificação para os diferentes *primers* foram:

***Egl***: 2 U de enzima *Taq* polimerase (Fermentas), 1X tampão de reação da enzima, 0,2 mM de dNTPs, 0,4 µM de cada *primer* e 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>. O programa de amplificação das amostras consistiu de um ciclo de denaturação inicial a 96 °C/9 min.; seguido de 30 ciclos a 95 °C/1 min; 70 °C/1 min. e 72 °C/2min; e um ciclo de extensão final a 72 °C/10 min. Os *primers* utilizados para amplificação do fragmento específico de 750 pb foram: Endo-F (5' ATG CAT GCC GCT GGT CGC CGC 3'), e Endo-R(5' GCG TTG CCC GGC ACG AAC ACC 3') (WICKER et al., 2007).

***MutS***: 1,25 U de enzima *Taq* polimerase (Fermentas), 1X tampão de reação da enzima, 0,2 mM de dNTPs, 0,2 µM de cada *primer* e 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>. O programa de amplificação das amostras consistiu de um ciclo de denaturação inicial a 96 °C/5 min.; seguido de 35 ciclos a 94 °C/1 min.; 66 °C/1 min. e 72 °C/1min e 30 s; e um ciclo de extensão final a 72 °C/5 min. Os *primers* utilizados para amplificação do fragmento específico de aproximadamente 758

pb foram: mutS-RsF 1570 (5' ACA GCG CCT TGA GCC GGT ACA 3') e mutS-RsR 1926 (5' GCT GAT CAC CGG CCC GAA CAT 3') (WICKER et al., 2007).

Após a amplificação, os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1,5 %), tampão TAE 1X corado com brometo de etídio (10 mg/mL).

#### **3.4.4.2. Sequenciamento dos produtos de PCR**

Os produtos da amplificação de parte dos genes *Egl* e *MutS* foram purificados com kit Promega Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System, seguindo o protocolo do fabricante. Após a purificação, os produtos foram enviados ao Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética da UNICAMP (CBMEG) para sequenciamento, utilizando-se o sistema ABI PRISM 3700 DNA Analyzer – Applied Biosystems – HITACHI.

#### **3.4.4.3. Análise filogenética das seqüências**

As seqüências obtidas de parte dos genes de *Egl* e *MutS* foram editadas e alinhadas utilizando-se o programa BioEdit (HALL, 1999).

A partir do alinhamento das seqüências, foram construídas árvores filogenéticas utilizando-se o método *Neighbour-Joining* no programa MEGA (KUMAR et al., 2004). Análises de *bootstrap* com 1000 repetições foram realizadas para fornecer suporte aos ramos das arvores filogenéticas geradas no programa. A título de comparação e análise das árvores, foram incluídas seqüências das mesmas regiões, disponíveis na base de dados do GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)).



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Agressividade das linhagens de *R. solanacearum* a plantas de tomate, fumo e batata

Para o teste de agressividade foram selecionadas 22 linhagens de *R. solanacearum* e das três espécies de solanáceas testadas a batata cv. Ágata foi a mais suscetível à bactéria, apresentando índice de doença maior ou igual a 80% para 19 linhagens, 13 dias após a inoculação. Aos 27 dias após a inoculação apenas duas linhagens (IBSBF 2525 e 2568, ambas obtidas de eucalipto) apresentaram índice de doença menor que 90% (Tabela 7).

Todas as linhagens utilizadas nesse experimento foram capazes de induzir sintomas de murcha em mudas de tomate, sendo que as linhagens IBSBF 292, 625, 623, 1548 e 2131 foram as menos agressivas, gerando índices de doença menores ou iguais a 55%. As linhagens mais agressivas foram IBSBF 33, 59, 309, 1712, 1839, 1882, 2000 e 2525, gerando índices de doença de 100%, 13 dias após a inoculação, exceto a linhagem IBSBF 2000 que causou a morte das plântulas de tomate seis dias após a inoculação (Tabela 7). Embora a linhagem mais agressiva a esse hospedeiro (IBSBF 2000) seja classificada como BvIII, os dados obtidos neste experimento corroboram com os resultados de Silveira et al. (1998) os quais apresentaram diferença de agressividade entre as 28 linhagens testadas (14 linhagens pertencentes à BvI e 14 da BvIII), sendo que não houve

diferença entre biovares. Cabe salientar que duas das linhagens da BvII/R3 ou seja IBSBF 59 e 1712 isoladas de batata e gerânio, respectivamente, apresentaram resultado superior às linhagens da raça 1, quando inoculadas em tomateiro. Ji et al. (2007) observaram que após a inoculação de 12 linhagens provenientes de plantas ornamentais, três de pimentão, três de tomate, quatro de fumo e três de batata, classificadas em diferentes biovares, que não houve diferença significativa de agressividade entre as linhagens testadas em plantas de tomate. Entretanto, Martins et al. (1988) estudando a virulência de 20 linhagens (classificadas como BvI e III), sob diferentes temperaturas, concluíram que a expressão da virulência para alguns isolados de *R. solanacearum* pode estar relacionada com o regime de temperaturas mais elevadas.

No presente estudo as plantas de fumo foram as mais tolerantes às linhagens testadas, sendo que apenas quatro linhagens mostraram-se mais agressivas gerando índices de doença maiores ou iguais a 80% (IBSBF 309, 292, 2131 e 1545). Apesar de todos os isolados terem causado doença nas plantas de fumo, os menos agressivos foram os IBSBF 624, 625, 1148, 1546, 59, 1548, 1839, 2000 e 2577 gerando índices de doença iguais ou inferiores a 25% (Tabela 7). Os resultados dos experimentos corroboraram com Ji et al. (2007), onde o fumo foi menos sensível a *R. solanacearum* que o tomateiro. Os dados obtidos no presente estudo são relevantes uma vez que trabalhos sobre a agressividade de *R. solanacearum* ao fumo são escassos na literatura. Desta forma, as linhagens de *R. solanacearum* aqui avaliadas foram mais agressivas à plantas de batata do que ao tomateiro e ao fumo. Independentemente da agressividade das linhagens estudadas, estas mostraram-se patogênicas às plantas de batata, fumo e tomate.

Tabela 7. Agressividade de linhagens de *R. solanacearum* avaliadas em plantas de batata cv. Ágata, tomate cv. Petomech VF e fumo var. Burley, através do Índice de Doença (%) calculado a partir da escala de notas adaptada de Morgado, Lopes & Takatsu (1992), utilizando a equação proposta por Winstead & Kelman (1952).

Cód.	Batata						Tomate						Fumo						
	IBSBF	6 DAI	13 DAI	20 DAI	27 DAI	27 DAI	6 DAI	13 DAI	20 DAI	27 DAI	27 DAI	6 DAI	13 DAI	20 DAI	27 DAI	6 DAI	13 DAI	20 DAI	27 DAI
33	50*	90	100	100	-	-	45	100	-	-	-	0	0	35	35	0	0	35	35
59	80	100	-	-	-	-	55	100	-	-	-	0	0	20	25	0	0	20	25
309	90	100	-	-	-	-	45	100	-	-	-	20	95	100	-	20	95	100	-
623	70	90	100	100	-	-	30	40	50	50	50	5	10	15	40	5	10	15	40
624	85	100	-	-	-	-	20	40	45	80	80	0	0	20	20	0	0	20	20
625	30	85	100	100	-	-	0	25	30	40	40	0	0	15	20	0	0	15	20
638	80	100	-	-	-	-	10	30	45	60	60	0	15	35	40	0	15	35	40
1148	65	100	-	-	-	-	10	35	40	60	60	0	0	20	20	0	0	20	20
1545	50	100	-	-	-	-	30	60	65	75	75	0	0	10	80	0	0	10	80
1546	60	100	-	-	-	-	45	60	40	65	65	0	0	20	20	0	0	20	20
1548	70	100	-	-	-	-	0	30	40	55	55	5	20	20	25	5	20	20	25
1712	75	100	-	-	-	-	50	100	-	-	-	0	5	30	30	0	5	20	30
1839	100	-	-	-	-	-	75	100	-	-	-	0	0	20	25	0	0	20	25
1882	100	-	-	-	-	-	65	100	-	-	-	0	5	35	35	0	5	30	35
2000	40	80	90	90	90	90	100	-	-	-	-	0	0	25	25	0	0	25	25
2131	100	-	-	-	-	-	35	50	50	55	55	25	70	95	95	25	70	75	95
2518	50	100	-	-	-	-	25	85	85	85	85	5	40	65	65	5	40	40	65
2525	0	40	55	55	85	85	65	100	-	-	-	0	40	60	60	0	40	40	60
2548	100	-	-	-	-	-	45	80	85	85	85	0	15	60	60	0	15	35	60
2577	5	65	80	80	100	100	20	55	65	80	80	0	0	25	25	0	0	20	25
2568	0	35	70	70	85	85	30	60	65	80	80	0	30	55	55	0	30	40	55
292 <sup>T</sup>	75	100	-	-	-	-	15	30	40	50	50	45	80	100	100	45	80	100	-

IBSBF = Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico, Campinas, SP.

- = não avaliado; <sup>T</sup> = linhagem tipo da espécie; \* = Valores de Índice de Doença; DAI = Dias após a inoculação.

#### 4.2. Microbiolização *in vitro* em sementes de eucalipto

O ensaio de microbiolização *in vitro* utilizando sementes de *Eucalyptus grandis* demonstrou, após 30 dias da inoculação, que as 22 linhagens testadas interferiram na germinação ou no crescimento normal das plântulas (Figura 2 e Tabela 8). A maior porcentagem de plantas sadias (%PS) foi observada nas inoculações com as linhagens IBSBF 59, seguida por IBSBF 2518 (15,4%) e IBSBF 1882 e 2000 (7,7%) indicando menor suscetibilidade das plântulas de eucalipto a essas linhagens. A linhagem IBSBF 2568 seguido de 2577, 1546, 33, 292, 624 e 2000 e foram as que mais reduziram a germinação das sementes (%NG). O maior número de plântulas mortas ou colonizadas (%PC-PM) foi observado nos isolados IBSBF 309, 623, 1545, 638 e 1712. Testes similares de microbiolização *in vitro* foram efetuados por Mafia (2006) que utilizou 46 linhagens provenientes de eucalipto. O autor verificou que 30 linhagens resultaram na morte das plântulas e 16 não alteraram o desenvolvimento das plântulas, indicando a grande variação de agressividade das diferentes linhagens testadas sobre a germinação e crescimento de plântulas de eucalipto, nos padrões testados. No presente estudo, todas as 22 linhagens testadas alteraram o desenvolvimento das plântulas indicando ausência de especificidade na patogenicidade das linhagens avaliadas em eucalipto.

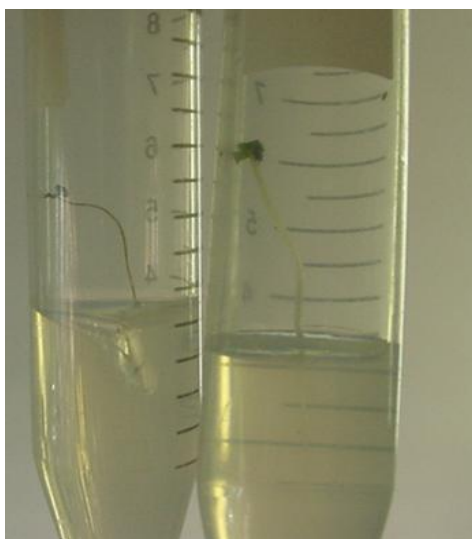


Figura 2. Crescimento observado no teste de microbiolização *in vitro* em sementes de eucalipto. À esquerda semente inoculada com o isolado IBSBF 2131, à direita, testemunha.

Tabela 8. Influência da microbiolização *in vitro* em sementes de eucalipto com linhagens de *R. solanacearum*, de diferentes hospedeiras, avaliado através da porcentagem de plântulas sadias, germinação de sementes e colonização ou morte das plântulas.

<b>Cód. IBSBF</b>	<b>Biovar</b>	<b>% Plântulas Sadias</b>	<b>% Sementes Não Germinadas</b>	<b>% Plântulas Colonizadas ou Mortas</b>
33	I	0	76,9	23,1
59	II	23,1	46,5	30,3
309	I	0	38,5	61,5
623	I	0	46,2	53,8
624	II	0	84,6	15,4
625	I	0	58,3	41,7
638	I	0	50	50
1148	I	0	53,8	46,2
1545	I	0	46,1	53,9
1546	I	0	76,9	23,1
1548	I	0	53,8	46,2
1712	II	0	50	50
1839	III	0	61,5	38,5
1882	III	7,7	53,8	38,5
2000	III	7,7	69,2	23,1
2131	I	0	61,5	38,5
2518	I	15,4	53,8	30,8
2525	I	0	61,5	38,5
2548	I	0	61,5	38,5
2577	I	0	76,9	23,1
2568	I	0	84,6	15,4
292 <sup>T</sup>	I	0	69,2	30,8
<b>Testemunha</b>		76,9	23,1	0

IBSBF = Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico, Campinas, SP.

<sup>T</sup> = linhagem tipo da espécie.

#### 4.3. Diversidade genética das linhagens de *R. solanacearum* por BOX e ERIC-PCR

A diversidade genética de 41 linhagens de *R. solanacearum* foi avaliada por meio da análise comparativa entre os padrões eletroforéticos, gerados pela amplificação de seqüências conservadas e repetitivas do DNA genômico, que possibilitou a

construção de dendogramas com base na similaridade dos padrões eletroforéticos determinados pelo uso de cada iniciador (BOX e ERIC-PCR), bem como a análise conjunta desses marcadores moleculares.

#### 4.3.1. BOX-PCR

Os padrões de bandas gerados pela amplificação de seqüências repetitivas do DNA bacteriano de algumas linhagens com o iniciador BOX A1R encontram-se nas Figuras 3 e 4.

A análise do polimorfismo das 41 linhagens de *R. solanacearum* foi efetuada por meio de construção de dendograma de similaridade (Figura 5). A comparação entre os padrões de bandas dos DNAs genômicos amplificados pelo iniciador BOX A1R indicou grande diversidade genética entre as linhagens testadas nesse trabalho, separando-as em dois grupos; o primeiro grupo ficou representado apenas por linhagens de *R. solanacearum* isoladas de *Pelargonium* R3/BvII (IBSBF 1708, 1711 e 1712), não incluindo linhagens classificadas como R3/BvII provenientes de batata (IBSBF 59, 134) e eucalipto (IBSBF 624). O segundo grupo ficou composto pelas 38 linhagens restantes, sendo que não foi observada correlação com hospedeiro, raça, biovar ou local de origem da linhagem. Este grupo ficou dividido em dois subgrupos, o subgrupo “a”, composto por 16 linhagens, e o subgrupo “b” composto por 22 isolados, sendo que as linhagens de *R. solanacearum* isoladas de banana provenientes de Sergipe (R2/BvI), apresentaram 100% de similaridade entre si. Quando comparadas com as linhagens de banana oriundas do Amazonas (IBSBF 188 e 1543) e uma linhagem de tomateiro (IBSBF 33), R1/BvI, proveniente de Elias Fausto – SP, observou-se aproximadamente 50% de similaridade entre esses dois grupos. Embora a linhagem IBSBF 2644 (R2/BvI) isolada de helicônia (Pernambuco) e pertencente a mesma biovar e raça, essa linhagem apresentou aproximadamente 30% de similaridade com as linhagens isoladas de banana oriundas de Sergipe e Amazonas, indicando que esse baixo índice de similaridade pode estar relacionado à origem do hospedeiro.

Foi possível o agrupamento das linhagens IBSBF 1560 (berinjela) e 1545 (*Melanthera*) provenientes da Amazônia, com aproximadamente 67,5% de

similaridade. As linhagens isoladas de begônia (IBSBF 1839, 1882 e 1883) de diferentes localidades do Estado de São Paulo foram agrupadas com similaridade de 100% entre elas. Essas linhagens classificadas como da BvIII mostraram similaridade aproximada de 20% com a linhagem IBSBF 2000, também classificada como BvIII. A linhagem IBSBF 2548 proveniente de eucalipto, do Estado do Pará, mostrou similaridade aproximadamente 62,5% com linhagens IBSBF 2525 e 2526 provenientes de eucalipto do estado da Bahia.

Os resultados obtidos nesse estudo corroboraram com os obtidos por Smith et al. (1995), que concluíram que a metodologia de BOX-PCR não foi eficiente para diferenciar a raça 3 das demais. Silveira et al. (2005) concluíram que este iniciador não foi eficiente para detectar a diversidade entre linhagens de batata da BvII, divergindo dos resultados obtidos no presente estudo, pois foi verificada similaridade de apenas 18% entre as duas linhagens da batata IBSBF 59 e 134 (R3/BvII). Ainda, os dados apresentaram alto grau de polimorfismo entre as linhagens de *R. solanacearum*, assim como foi demonstrado nos trabalhos de Martins & Rudolph (2002) e Costa et al. (2007).

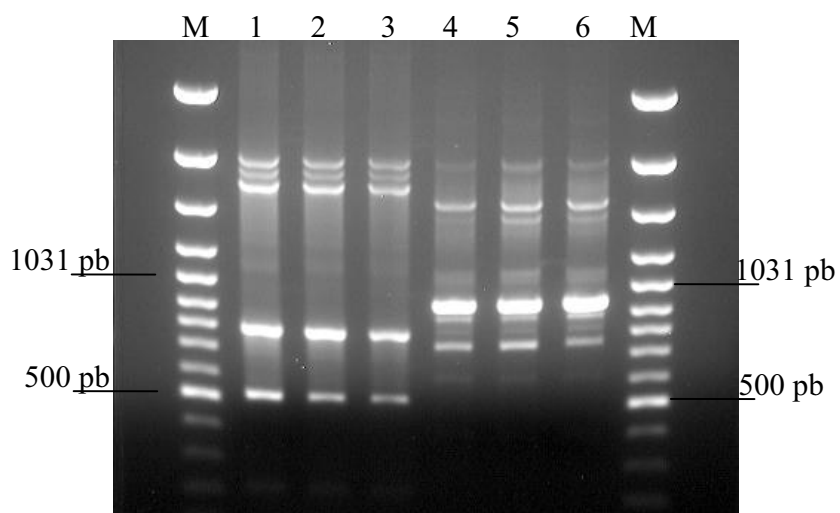


Figura 3. Produtos da amplificação do DNA de linhagens de *R. solanacearum* utilizando-se o primer BOX A1R (M) marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas), (1) IBSBF 1708, (2) IBSBF 1711, (3) IBSBF 1712, (4) IBSBF 1839, (5) IBSBF 1882 e (6) IBSBF 1883.

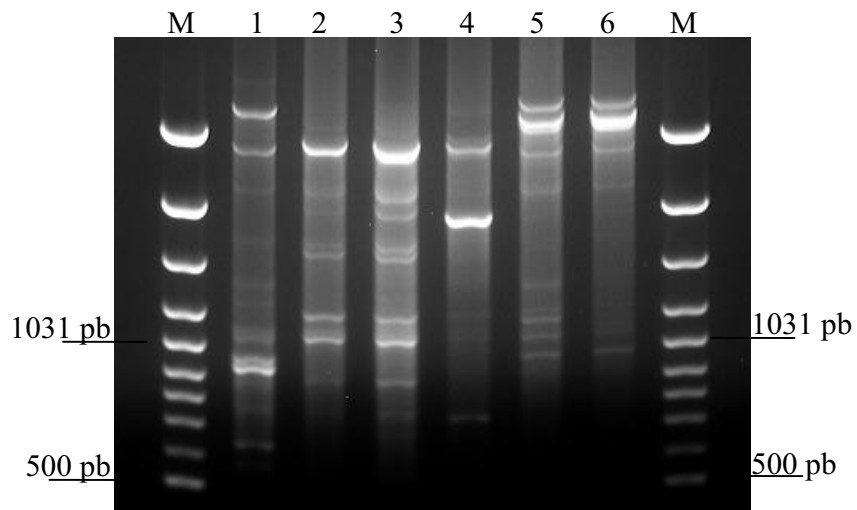


Figura 4. Produto da amplificação do DNA de diferentes linhagens de *R. solanacearum* isoladas de *Eucalyptus* sp. por iniciador de BOX AR1, (M) marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas), (1) IBSBF 2133, (2) IBSBF 2525, (3) IBSBF 2526, (4) IBSBF 2548, (5) IBSBF 2568 e (6) IBSBF 2576.



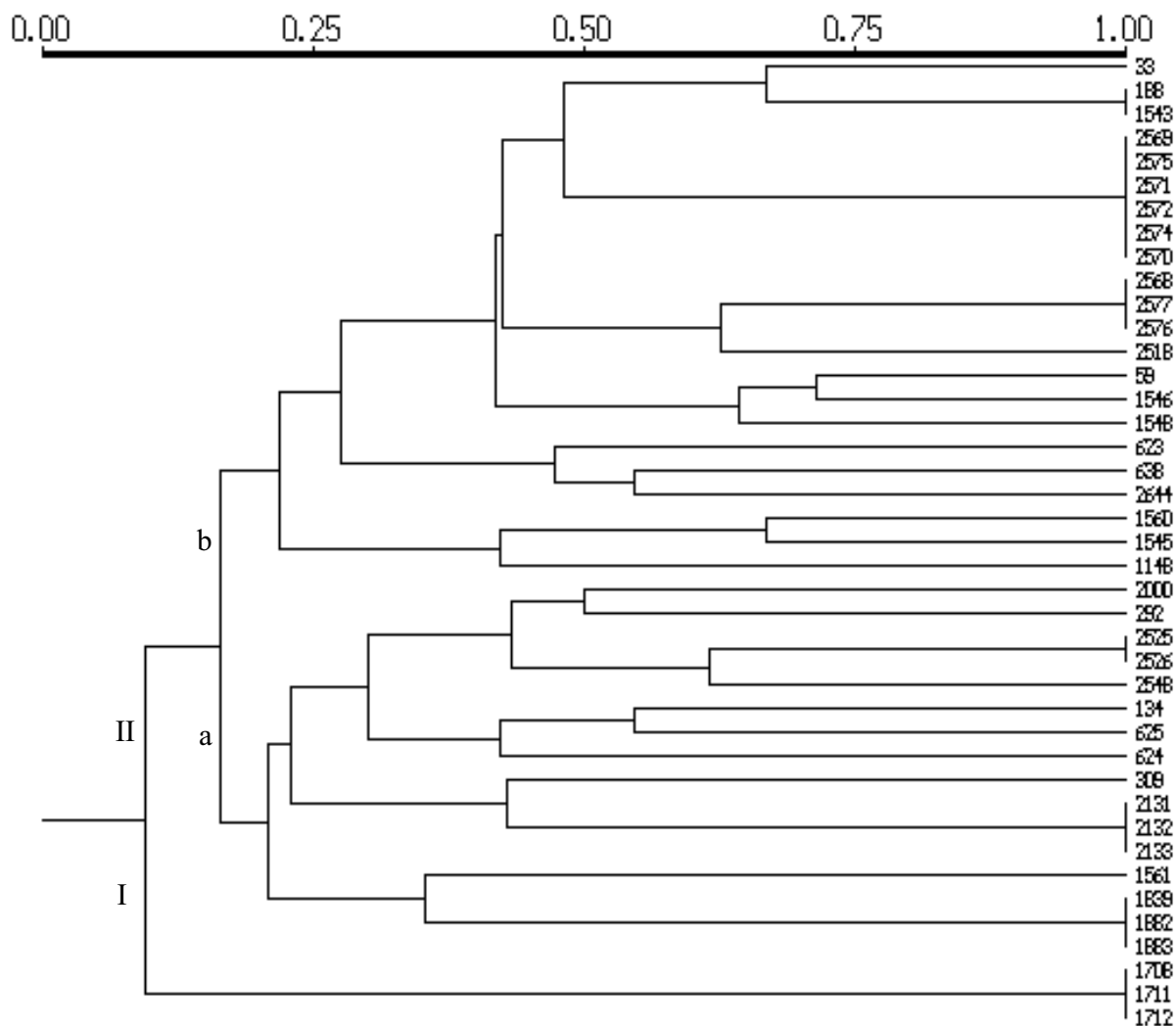


Figura 5. Dendrograma gerado de acordo com os perfis de amplificação das 41 linhagens de *R. solanacearum* utilizando o iniciador BOX AR1, baseado no método UPGMA, utilizando coeficiente de similaridade Dice.

#### 4.3.2. ERIC-PCR

Assim como nos experimentos de BOX-PCR, os padrões gerados pela amplificação de seqüências repetitivas do DNA genômico pelos iniciadores de ERIC1R e ERIC2 revelaram alto nível de diversidade genética entre os isolados testados.

As Figuras 6 e 7 ilustram as bandas geradas pela amplificação das seqüências repetitivas do DNA bacteriano pelos iniciadores ERICR1 e ERIC 2.

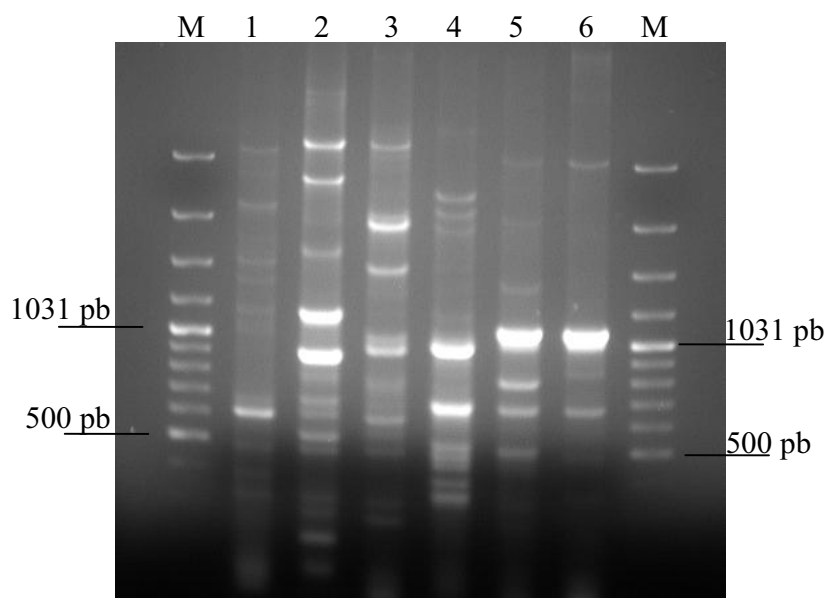


Figura 6. Gel de agarose contendo produto da amplificação do DNA de linhagens de *R. solanacearum* por iniciadores de ERICR1 e ERIC 2. (M) marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas), (1) IBSBF 1560, (2) IBSBF 1561, (3) IBSBF 1148, (4) IBSBF 1545, (5) IBSBF 1546 e (6) IBSBF 1548.

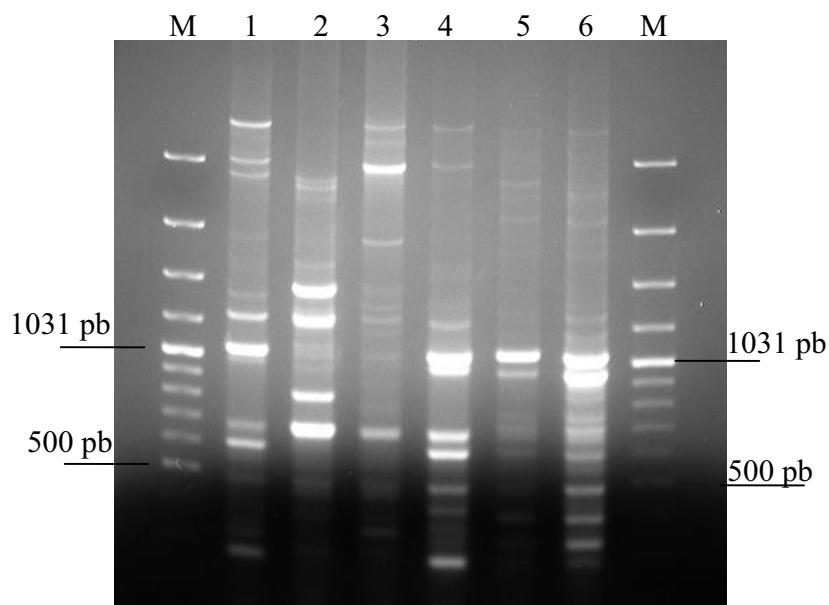


Figura 7. Gel de agarose contendo produto da amplificação do DNA de isolados de *R. solanacearum* por iniciadores de ERICR1 e ERIC 2, mostrando a diversidade entre algumas linhagens provenientes de *Eucalyptus*. (M) marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas), (1) IBSBF 623, (2) IBSBF 624, (3) IBSBF 625, (4) IBSBF 638, (5) IBSBF 2131 e (6) IBSBF 2132.

A análise do polimorfismo das linhagens foi efetuada por meio da construção de dendograma de similaridade (Figura 8). O dendograma gerado com base na similaridade entre os isolados permitiu a separação das linhagens em dois grupos, denominados de “I” e “II”.

O grupo “I” ficou composto apenas por duas linhagens de banana provenientes do Amazonas e uma linhagem de helicônia proveniente de Pernambuco (IBSBF 188, 1543 e 2644 respectivamente), com similaridade de aproximadamente de 55%. O grupo “II” compreendeu as 38 linhagens restantes, divididas em dois subgrupos, “a” e “b”, cada um deles com 19 linhagens, sendo que não foi observada correlação com hospedeiro, raça, biovar ou local de origem das linhagens.

Analisando-se as 13 linhagens de *R. solanacearum* isoladas de eucalipto, oriundas de diferentes regiões geográficas do país, verificou-se alta diversidade genética entre elas, inclusive entre linhagens com procedência dos mesmos estados (Bahia, Pará e Santa Catarina). Foi observada similaridade de aproximadamente 47% entre linhagens de eucalipto provenientes da Bahia (IBSBF 625) e de Santa Catarina (IBSBF 2576 e 2577), porém as últimas linhagens tiveram similaridade menor que 25% com relação a linhagem IBSBF 2568, oriunda de eucalipto, do mesmo estado de origem. As linhagens de eucalipto provenientes do Pará (IBSBF 623 e 638) apresentaram 70% de similaridade entre elas, porém apenas 26% em comparação com a linhagem IBSBF 624 e 20% com a IBSBF 2548 do mesmo estado.

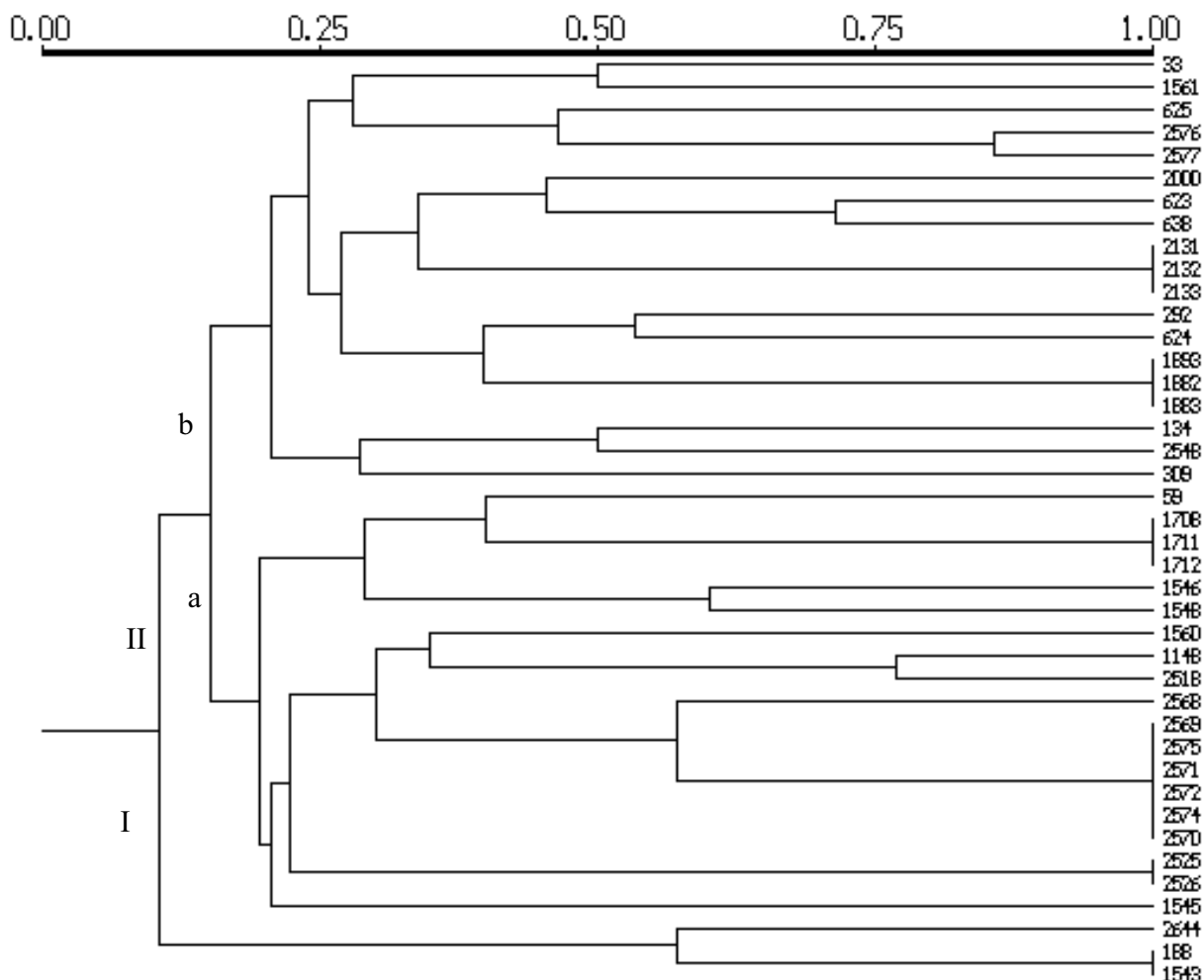


Figura 8. Dendograma gerado de acordo com os perfis de amplificação das 41 linhagens de *R. solanacearum* utilizando os iniciadores ERIC1R e ERIC2, baseado no método UPGMA utilizando coeficiente de similaridade Dice.

#### 4.3.3. Análise por ERIC/BOX-PCR

Foi também efetuada por meio da construção de um dendograma utilizando em conjunto as matrizes dos iniciadores de BOX AR1, ERIC 1R e ERIC 2. A

análise do polimorfismo entre as linhagens testadas, esta análise permitiu separar as linhagens em dois grupos (Figura 9).

O grupo “I” ficou composto por cinco linhagens separados em dois subgrupos, sendo o primeiro subgrupo denominado “b” está composto por três linhagens isoladas de *Pelargonium* (IBSBF 1708, 1711 e 1712) e o segundo subgrupo “a”, incluiu uma linhagem de tomate (IBSBF 2000) e uma de berinjela (IBSBF 1560), ambas oriundas do Amazonas. Os subgrupos apresentaram similaridade de aproximadamente 20% entre si.

O segundo grupo, denominado “II”, ficou composto pelas 36 linhagens restantes também divididas em dois subgrupos, denominados de “a” e “b”, com similaridade entre si de 15%. O subgrupo “a” com por 19 linhagens, todas pertencentes a BvI, com exceção da linhagem IBSBF 59, da BvII. Neste subgrupo também ficaram incluídas todas as linhagens de banana, juntamente com a linhagens de helicônia (IBSBF 2644), espécie vegetal da família Heliconiaceae (gênero *Heliconia*), anteriormente pertencente a família *Musacea*, também hospedeira de *R. solanacearum* R2, causadora do Moko da bananeira. As linhagens provenientes de banana do Amazonas (IBSBF 188 e 1543) apresentaram aproximadamente 50% similaridade com a linhagem de helicônia oriunda de Pernambuco (IBSBF 2644). Ainda, este subgrupo incluiu as três linhagens de eucalipto provenientes de Santa Catarina, que ficaram separadas das dez linhagens restantes daquela hospedeira, oriundas dos estados de Minas Gerais, Bahia e Pará. Foi constatada similaridade de 70% entre as três linhagens de eucalipto oriundas de Santa Catarina (IBSBF 2568, 2576 e 2577), sendo que nas duas últimas, houve similaridade próxima a 90% entre si. Foi observada similaridade de aproximadamente 60% entre as linhagens de eucalipto provenientes do Pará (IBSBF 623 e 638), sendo eles similares em apenas 35% quando comparados com as linhagens de eucalipto de Minas Gerais (IBSBF 2131, 2132 e 2133). Similaridade de aproximadamente 50% foi detectada entre a linhagem de eucalipto oriunda do Pará (IBSBF 2548) das linhagens provenientes da Bahia (IBSBF 2525 e 2526).

Horita & Tsuchiia (2001) analisaram por rep-PCR (REP, BOX e ERIC) 74 linhagens de *R. solanacearum* oriundas do Japão, resultando em divisões similares às descritas por Cook et al. (1991), indicando a confiabilidade da metodologia empregada.

A análise dos resultados apresentados mostra a alta diversidade genética das linhagens aqui testadas, não sendo possível separá-las entre biovares ou raças apenas com esta metodologia de análise. Os trabalhos desenvolvidos por Cook et al, (1991) e Horita & Tsuchiyya (2001) corroboram em parte com os dados aqui descritos.

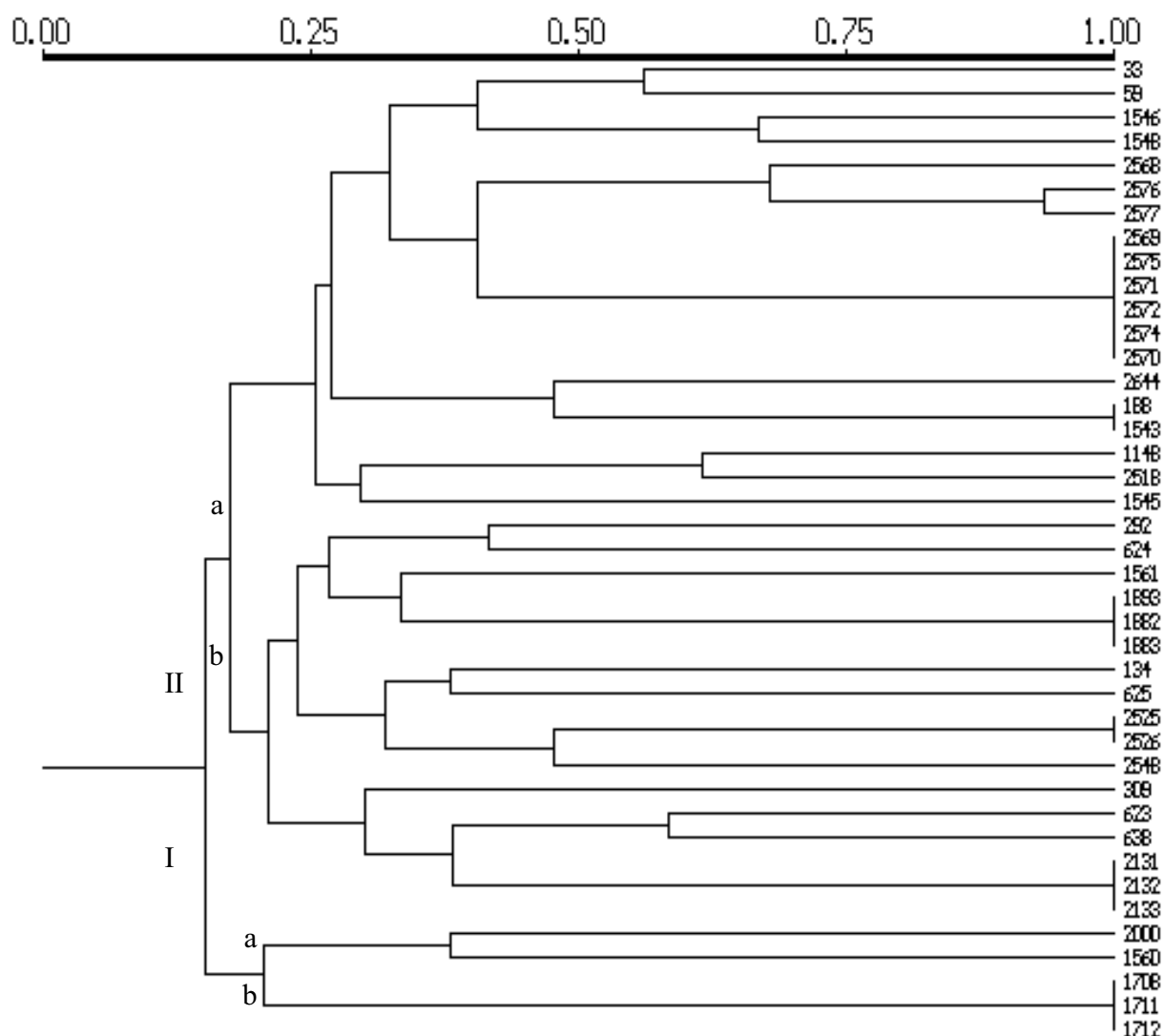


Figura 9. Dendrograma gerado de acordo com os perfis de amplificação das 41 linhagens de *R. solanacearum* utilizando os iniciadores BOX AR1 e ERIC1R e ERIC2, baseado no método UPGMA e coeficiente de similaridade Dice.

#### 4.4. Análise da região espaçadora 16S-23S DNAr por PCR-RFLP

Nesse experimento foram testadas as enzimas de restrição *Alu* I, *Hinf* I, *Bsp*143 I, *Bsu*R I *Hpy*F3 I, *Msp* I, *Rsa* I, *Hin*6 I ou *Taq* I e somente a digestão dos produtos de amplificação da região espaçadora 16S-23S com enzimas de restrição *Taq* I ou *Hin*6 I permitiu separar as linhagens de *R. solanacearum* classificadas como BvIII (Figura 10). Nas digestões com enzima *Taq* I as linhagens classificadas como BvIII apresentaram um fragmento com aproximadamente 500 pb, enquanto que as outras linhagens pertencentes à biovars I e II apresentaram um fragmento de tamanho menor que 500 pb (aproximadamente 480 pb). A diferenciação das linhagens classificadas como BvIII ficou mais evidente com a enzima *Hin*6 I, que num fragmento com aproximadamente 1000 pb para as biovars I e II e dois fragmentos com 600 e 400 pb para as linhagens classificadas como BvIII. Resultados semelhantes foram descritos por e Fouché-Weich et. al. (2006), que separaram a BvII da BvIII utilizando a técnica de PCR-RFLP gene *hrp*. Essa mesma técnica foi empregada por Poussier et al. (1999; 2000), que conseguiram separar as biovars I, II e III.

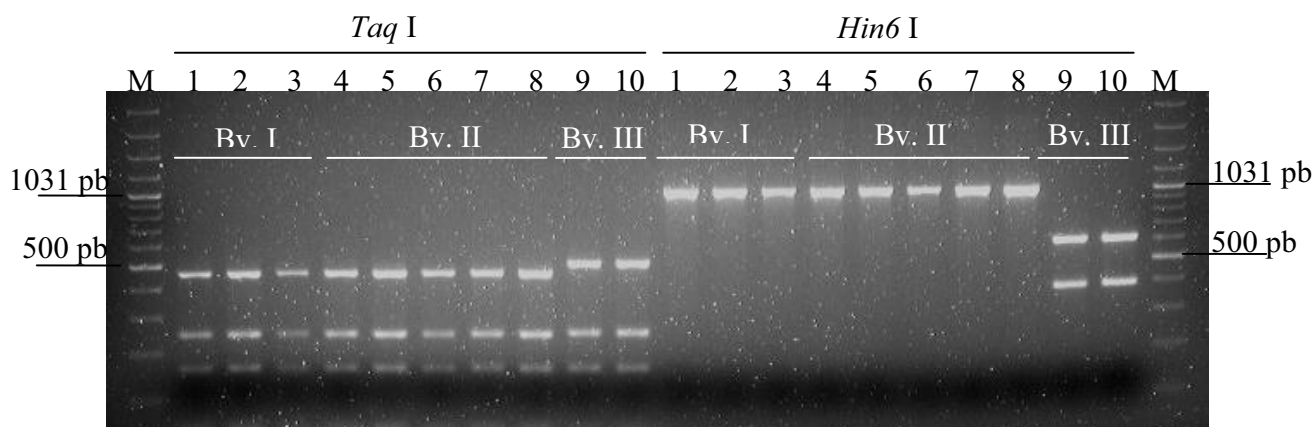


Figura 10. Digestão dos produtos de amplificação da região espaçadora 16S-23S DNAr com as enzimas *Taq* I e *Hin*6 I: (M) marcador de peso molecular 100pb (Fermentas) (1)IBSBF 33, (2)IBSBF 309, (3)IBSBF 2131, (4) IBSBF 134, (5)IBSBF 1708, (6)IBSBF 1712, (7) IBSBF 59, (8) IBSBF 624, (9) IBSBF 1882, (10) IBSBF 2000.



#### 4.5. Análise filogenética pelos genes *endoglucanase (Egl)* e *MutS*

Recentemente Fegan & Prior (2005) propuseram um novo esquema para classificação de *R. solanacearum*, denominado filotipo, o qual está baseado na análise de sequências da região ITS (*internal transcribed spacer region*), do gene de *Endoglucanase (Egl)* e do gene *MutS*. Os filotipos propostos estão relacionados às regiões geográficas de origem das linhagens, sendo que o filotipo I corresponde a linhagens oriundas da Ásia, biovars III, IV e V; o filotipo II corresponde a linhagens provenientes das Américas, BvI, BvII e BvIIT; o filotipo III corresponde as linhagens oriundas da África e ilhas ao redor, biovars I e IIT; e o filotipo IV corresponde a linhagens provenientes da Indonésia, algumas do Japão e uma da Austrália, biovars I, II e IIT. Assim, no presente estudo foi efetuado o sequenciamento de parte dos genes *Egl* e *MutS* objetivando-se classificar em filotipos as linhagens analisadas nesse estudo. Após o alinhamento das sequências foram construídas árvores filogenéticas utilizando-se o método *Neighbour-Joining* (SAITOU & NEI, 1987) no programa MEGA (KUMAR et al., 2004) em análises de *bootstrap* com 1000 repetições.

##### 4.5.1. Análise do gene *Endoglucanase (Egl)*

A amplificação do DNA genômico com os *primers* Endo-F e Endo-R correspondentes à parte do gene de Endoglucanase resultou num fragmento de 750 pb para todas as 41 linhagens selecionadas de *R. solanacearum* deste estudo, sendo que no caso de linhagens oriundas de mesmo hospedeiro, região geográfica e mesmo perfil genético obtido por rep-PCR selecionou-se apenas uma ou duas linhagens representantes de cada grupo

A título de comparação e interpretação dos dados foram incluídas seqüências do GenBank., correspondentes às linhagens pertencentes aos filotipos I, II, III e IV, depositadas por Wicker et al. (2007), sendo que os filotipos I e III são considerados inexistentes em nosso país. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 11 e Tabela 9.



Figura 11. Árvore filogenética baseada no sequenciamento de parte de gene de *endoglucanase (Egl)* das linhagens de *R. solanacearum*, utilizando-se *Neighbour-Joining* (NJ). Os números em cada um dos ramos representam as porcentagens de ocorrência dos agrupamentos com base em análises de bootstrap de 1000 repetições. A barra indica 5 % de diferença nas sequências. \*= Sequencias obtidas no GenBank.

A árvore filogenética construída, correspondente à parte de gene *Egl*, agrupou as linhagens IBSBF 1839, 1882, 1883 e 2000, pertencentes a R1/BvIII, no filotipo I. Cabe ressaltar que o filotipo I compreende as linhagens oriundas da Ásia, segundo Fegan & Prior (2005), Wicker et al. (2007), Ji et al., (2007) e Perez et al., (2008).

De acordo com Fegan & Prior (2005), o filotipo II corresponde às linhagens da América, pertencentes às biovares I, II e IIT, o qual ainda está dividido nos subgrupos A e B. No presente estudo, as linhagens pertencentes às biovares I e II também ficaram agrupadas no filotipo II, corroborando com Wicker et al. (2007). As linhagens causadoras do Moko da bananeira analisadas foram classificadas como filotipo II, subgrupo A. As linhagens pertencentes à BvI foram agrupadas no filotipo II, subgrupo A, com exceção da linhagem IBSBF 1561 (isolada de jiló, do Amazonas), que foi alocada com as linhagens classificadas como BvI, no filotipo II, subgrupo B. Ainda, verificou-se que no filotipo II B as linhagens pertencentes à Bv I ficaram separadas das demais do mesmo subgrupo.

#### **4.5.2. Análise do gene *MutS***

A amplificação do DNA genômico com os *primers* mutS-RsF e mutS-RsR correspondentes à parte do gene *MutS* resultou num fragmento de aproximadamente 750 pb para todas as 41 linhagens de *R. solanacearum* deste estudo. Assim como na análise de parte de gene *Egl*, as mesmas linhagens foram utilizadas para a classificação em filotipos do gene *MutS*. A partir do sequenciamento de parte do gene *MutS*, foi também construída uma árvore filogenética incluindo-se as sequências depositadas no GenBank por Wicker et al., (2007). Os dados obtidos estão apresentados na Figura 12 e Tabela 9.

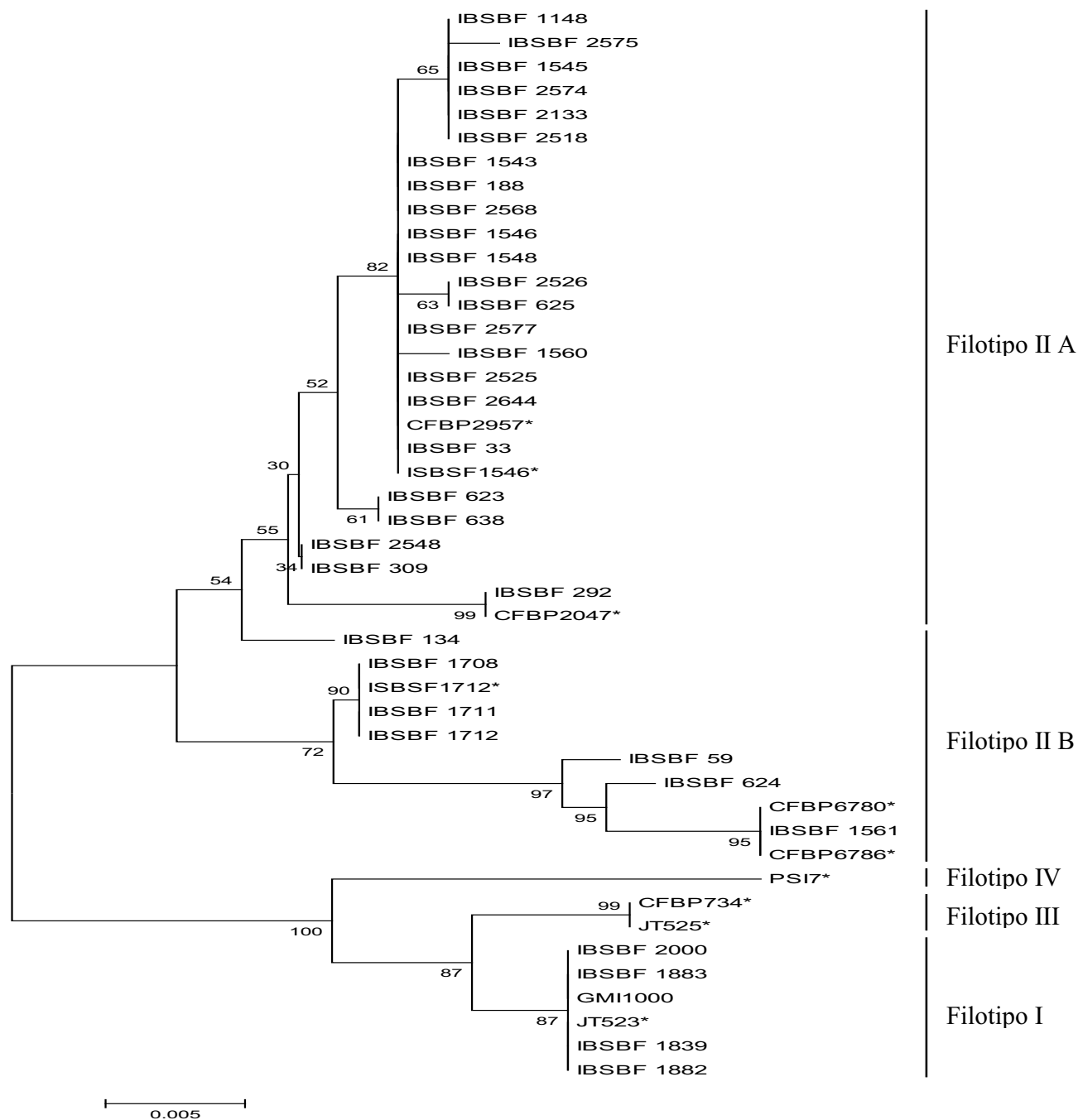


Figura 12. Árvore filogenética baseada no sequenciamento de parte de gene de *MutS* das linhagens de *R. solanacearum*, utilizando-se *Neighbour-Joining* (NJ). Os números em cada um dos ramos representam as porcentagens de ocorrência dos agrupamentos com base em análises de bootstrap de 1000 repetições. A barra indica 5 % de diferença nas sequências. \*= Sequencias obtidas no GenBank.

Todas as linhagens utilizadas foram incluídas nos filotipos I e II, resultados que corroboram com os de Wicker et al. (2007) e Ji et al. (2007), onde as linhagens da biovar III foram agrupadas no filotipo I, e os demais linhagens pertencentes as Bvs I, II no filotipo II, separados, ainda, em subgrupos A e B. Assim como na análise de sequências de parte do gene *Egl*, as linhagens classificadas como BvII foram alocadas no filotipo II, subgrupo B, incluindo também a linhagem IBSBF 1561 (BvI). As linhagens IBSBF 1712 e IBSBF 1882, isoladas de plantas ornamentais (*Pelargonium* e Begônia respectivamente), foram classificadas nos filotipos IIB e I respectivamente, como observado por Wicker et al. (2007). Nessa análise verificou-se o mesmo agrupamento das linhagens classificadas como BvI no filotipo II B, separadas das demais.

Assim como observado para o gene de *egl*, nas análises do gene *MutS*, as linhagens IBSBF 1839, 1882 e 1883, isoladas de begônia, no estado de São Paulo; e IBSBF 2000 isolada de tomate no estado do Amazonas, também foram alocadas no filotipo I, que segundo dados de literatura aloca linhagens de origem asiática (FEGAN & PRIOR, 2005; WICKER et al., 2007; JI et al., 2007; PEREZ et al., 2008).

Santana et al. (2008), utilizando a metodologia de PCR multiplex para os diferentes filotipos, verificaram a predominância do filotipo II em 62 linhagens de *R. solanacearum* da BvII, isoladas de batata no Brasil. Os autores observaram, ainda, que uma linhagem isolada de pimentão foi classificada no filotipo IV, que é considerado prevalente na Indonésia.

Por outro lado, por meio da análise filogenética do gene *Endoglucanase*, Nouri et al. (2009) estudaram 40 linhagens de *R. solanacearum* isoladas de batata no Irã, e verificaram a ocorrência de duas linhagens pertencentes ao filotipo II (BvIIT), reconhecidas como de origem na América do Sul.

Coelho Netto et al. (1994) estudaram a distribuição de 320 isolados de *R. solanacearum* do estado do Amazonas, concluindo que cerca de 20 % das linhagens pertenciam à biovar III, ou seja, corresponderiam ao filotipo I.

Com o aumento gradativo do intercâmbio de materiais vegetais entre países de diferentes partes do globo, a distribuição de *R. solanacearum* em termos

regionais poderá sofrer alterações significativas, o que resultará em maior dificuldade na busca por soluções de manejo da murcha bacteriana.

Pelos resultados obtidos no presente trabalho, verificou-se que a grande maioria das linhagens (90 %) foram agrupadas no filotipo II, independente do hospedeiro e região de origem, o que de certa forma era esperado. Entretanto, foi verificada a ocorrência de quatro linhagens (10 %) classificadas como filotipo I. Considerando que Coelho Netto et al. (1994) classificaram 20 % das linhagens de *R. solanacearum* na Bv III (possivelmente pertencentes ao filotipo I), é provável que esse filotipo esteja distribuído mais amplamente em nosso país, principalmente na região norte devido às condições climáticas locais. Nesse sentido, um estudo futuro envolvendo um maior número de linhagens da BvIII de diferentes regiões geográficas do país poderá comprovar essa hipótese.

A compreensão do relacionamento evolucionário e diversidade genética de linhagens oriundas de diferentes espécies de hospedeiras de *R. solanacearum* eventualmente poderá levar ao desenvolvimento de ferramentas moleculares para o diagnóstico e identificação mais precisos.

Essas ferramentas poderão ser de grande utilidade no estudo da ecologia e epidemiologia desta importante espécie bacteriana.

O conhecimento da distribuição de *R. solanacearum* no país poderá ser de grande utilidade para programas de melhoramento genético de plantas, bem como para o emprego de medidas quarentenárias

Tabela 9. Lista de linhagens utilizadas para classificação das linhagens estudadas de *R. solanacearum* em filotipos.

Cód.	Hospedeiro	Biovar	Raça	Filotipo	Acesso do GenBank	
					<i>Egl</i>	<i>MutS</i>
GMI 1000*	<i>Solanum lycopersicum</i>	III	1	I	AF295251	AY756804
JT 523*	<i>Solanum tuberosum</i>	III	1	I	AF295252	AY756803
IBSBF 1839	<i>Begonia</i> hib.	III	1	I	HM142836	HM142869
IBSBF 1882	<i>Begonia</i> hib.	III	1	I	HM142838	HM142871
IBSBF 1883	<i>Begonia</i> hib.	III	1	I	HM142839	HM142872
IBSBF 2000	<i>Solanum lycopersicum</i>	III	1	I	HM142840	HM142873
CFPB 2047 <sup>T</sup> *	<i>Solanum lycopersicum</i>	I	1	II A	AF295262	AY756799
CFBP 2957*	<i>Solanum lycopersicum</i>	I	1	II A	AF295265	EF371845
IBSBF 1546*	<i>Fuchsia</i> sp.	I	1	II A	EF371838	EF371877
IBSBF 33	<i>Solanum lycopersicum</i>	I	1	II A	HM142852	HM142886
IBSBF 188	<i>Musa</i> sp.	I	2	II A	HM142837	HM142870
IBSBF 309	<i>Nicotiana tabacum</i>	I	1	II A	HM142851	HM142885
IBSBF 623	<i>Eucalyptus urophylla</i>	I	1	II A	HM142854	HM142888
IBSBF 625	<i>Eucalyptus urophylla</i>	I	1	IIA	HM142856	HM142890
IBSBF 638	<i>Eucalyptus urophylla</i>	I	1	II A	HM142857	HM142891
IBSBF 1560	<i>Solanum melongena</i>	I	1	II A	HM142831	HM142864
IBSBF 1148	<i>Marsypianthes chamedris</i>	I	1	II A	HM142825	HM142858
IBSBF 1543	<i>Musa</i> sp.	I	2	IIA	HM142827	HM142860
IBSBF 1545	<i>Melanthera discoidea</i>	I	1	II A	HM142828	HM142861
IBSBF 1546	<i>Fuchsia</i> sp.	I	1	II A	HM142829	HM142862
IBSBF 1548	<i>Oxalis</i> sp.	I	1	II A	HM142830	HM142863
IBSBF 2133	<i>Eucalyptus urophylla</i>	I	1	II A	HM142841	HM142874
IBSBF 2518	<i>Tagetes</i> sp.	I	1	II A	HM142842	HM142875
IBSBF 2525	<i>Eucalyptus urophylla</i>	I	1	II A	HM142843	HM142876
IBSBF 2526	<i>Eucalyptus urophylla</i>	I	1	II A	NS	HM142877
IBSBF 2548	<i>Eucalyptus urophylla</i>	I	1	IIA	HM142844	HM142878
IBSBF 2568	<i>Eucalyptus</i> sp.	I	1	IIA	HM142845	HM142879
IBSBF 2577	<i>Eucalyptus</i> sp.	I	1	II A	HM142848	HM142882
IBSBF 2574	<i>Musa</i> sp.	I	2	II A	HM142846	HM142880
IBSBF 2575	<i>Musa</i> sp.	I	2	II A	HM142847	HM142881
IBSBF 2644	<i>Heliconia</i> sp.	I	2	II A	HM142849	HM142883
IBSBF 292 <sup>T</sup>	<i>Solanum lycopersicum</i>	I	1	II	HM142850	HM142884
CFBP 6780*	<i>Solanum lycopersicum</i>	I	1	II B	EF371830	EF371864
CFBP 6786*	<i>Solanum lycopersicum</i>	I	1	II B	EF371823	EF371858

Continua...

Tabela 9. Continuação

<b>IBSBF 1712*</b>	<i>Pelargonium x hortorum</i>	II	3	<b>II B</b>	EF371833	EF371869
<b>IBSBF 59</b>	<i>Solanum tuberosum</i>	II A	3	<b>II B</b>	HM142853	HM142887
<b>IBSBF 134</b>	<i>Solanum tuberosum</i>	II	3	<b>II</b>	HM142826	HM142859
<b>IBSBF 624</b>	<i>Eucalyptus urophylla</i>	II T	3	<b>II B</b>	HM142855	HM142889
<b>IBSBF 1561</b>	<i>Solanum jilo</i>	I	1	<b>II B</b>	HM142832	HM142865
<b>IBSBF 1708</b>	<i>Pelargonium x hortorum</i>	II	3	<b>II B</b>	HM142833	HM142866
<b>IBSBF 1711</b>	<i>Pelargonium x hortorum</i>	II	3	<b>II B</b>	HM142834	HM142867
<b>IBSBF 1712</b>	<i>Pelargonium x hortorum</i>	II	3	<b>II B</b>	HM142835	HM142868
<b>CFPB 734*</b>	<i>Solanum tuberosum</i>	I	1	<b>III</b>	AF295274	AY756746
<b>JT 525*</b>	<i>Pelargonium x asperum</i>	I	-	<b>III</b>	AF295272	AY756786
<b>PSI 7*</b>	<i>Solanum lycopersicum</i>	-	-	<b>IV</b>	EF371804	AY756732

IBSBF = Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico, Campinas, SP;

CFBP = Collection Française de Bactéries Phytopathogènes;

<sup>T</sup> = linhagem tipo da espécie; \* = Sequências obtidas no GenBank; NS = não seqüenciado;

- = dados não obtidos.



## 5. CONCLUSÕES

Linhagens de *R. solanacearum* provenientes de solanáceas (batata, tomate, berinjela, jiló e fumo), plantas ornamentais e eucalipto foram patogênicas às plantas de batata cv. Ágata, fumo var. Burley e tomate cv. Petomech VF, sendo mais agressivas às plantas de batata cv. Ágata;

Com exceção das linhagens de *R. solanacearum* isoladas de helicônia e bananeira, que não foram utilizadas nos testes de agressividade por serem patógenos quarentenários, as demais linhagens foram patogênicas ao eucalipto independentemente das hospedeiras ou locais de origem, no teste de microbiolização de sementes *in vitro*;

A análise dos produtos da amplificação de seqüências repetitivas do DNA (BOX e ERIC-PCR) revelou alta diversidade genética entre linhagens de *R. solanacearum* não sendo possível separá-los com base nas hospedeiras de origem, raças ou biovars;

Linhagens de *R. solanacearum* R1/BvIII foram diferenciadas das Bvs. I e II pela técnica de PCR-RFLP, da região espaçadora 16S-23S DNAr, com as enzimas de restrição *Taq* I e *Hin6* I;

A análise filogenética de parte dos genes *Egl* e *MutS* revelou a ocorrência dos filotipos I e II de *R. solanacearum*, com predominância do filotipo II, sendo que, as linhagens pertencentes à BvIII foram alocadas no filotipo I.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G.; SARTÓRIO, R. C.; BINOTI, D. H. B.; SILVA, R. R.; LAU, D. & VANETTI, A. *Ralstonia solanacearum* em viveiros clonais de eucalipto no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 4, p. 357-366, 2006.

AUER, C. G.; SANTOS, A. F. & RODRIGUES NETO, J. Ocorrência de murcha bacteriana em plantios de *Eucalyptus grandis* no estado de Santa Catarina. **Resumos Tropical Plant Pathology**, v. 33, p. 370, 2008.

BERTOLLA, F.; FROSTEGARD, A.; BRITO, B.; NESME, X. & SIMONET, P. During infection of its hosts, the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* naturally develops a state of competence and exchanges genetic material. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 12, p. 467-472, 1999.

BOUCHER, C.; GUIDOT, A.; CARRÈRE, S.; PEETERS, N.; ELBAZ, M.; PRIOR P. & GENIN S. Genomic variability and evolution in *Ralstonia solanacearum*. **The 4<sup>th</sup> International Bacterial Wilt Symposium**. *Resumos* United Kingdom, p. 23, 2006.

BRADBURY, J.F. **Guide to plant pathogenic bacteria**. Farhan House: C.A.B. International, 1986. 332 p.

BRINGEL, J. M. M. **Caracterização Bioquímica, Patogênica e Molecular de Isolados de *Ralstonia solanacearum* Biovar 2 Isolados de Batata e Berinjela.** 2002. 123f. Tese (Doutorado), Universidade São Paulo, Piracicaba, São Paulo. 2002.

BUDDENHAGEN, I. W. & KELMAN, A. A Biological and physiological aspects of bacterial wilt Caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Annual Review of Phytopathology**, v. 2, p. 203, 1964.

CHAMPOISEAU, P. G. & JONES J. B. *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 causes Tropical losses and temperate anxieties. **Plant Health Progress**, 2009. Disponível em: <<http://www.apsnet.org/online/feature/ralstonia/ralstonia.pdf>> acesso em: 15 de fevereiro de 2010.

COELHO NETTO, R. A.; PEREIRA, B. G.; NODA, H. & BOHER, B. Caracterização de isolados de *Ralstonia solanacearum* obtidos de tomateiros em várzea e terra firme, no Estado do Amazonas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 4, 2003.

COELHO NETTO, R. A.; PEREIRA, B. G.; NODA, H. & BOHER, B. Murcha bacteriana no Estado do Amazonas, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 1, p. 21-27, 2004.

COOK, D.; BARLOW, E. & SEQUEIRA, L. DNA Probes as tools for the study of host-pathogen evolution: the example of *Pseudomonas solanacearum*. **Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions**, v. 1, p. 103-108, 1991.

COSTA, S. B.; FERREIRA, M. A. S. V. & LOPES, C. A. Diversidade patogênica e molecular de *Ralstonia solanacearum* da região amazônica brasileira. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 4, p. 285-294, 2007

DAUGHTREY, M. Southern bacterial wilt, caused by *Ralstonia solanacearum*. **Society of American Florists** 19<sup>th</sup> Annual Conference on Insect and Diseases Management on Ornamentals, 2003.

DIANESE, J. C. & TAKATSU, A. *Pseudomonas solanacearum* biovar 1 isolada de eucalipto em Monte Dourado, Estado do Pará. **Resumos Fitopatologia Brasileira**, v. 10, p. 362, 1985.

EPPO Diagnostics protocols for regulated pests: *Ralstonia solanacearum*. **Bulletin** 34, p. 173-178, 2004.

FEGAN, M. & PRIOR, P. How to complex is the *Ralstonia solanacearum* species complex. In: Allen C., Prior P. & Hayward A. C. (Eds.), **Bacterial Wilt: the disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex**, APS Press, 2004, p. 449-461.

FEGAN, M. & PRIOR, P. Diverse members of the *Ralstonia solanacearum* species complex cause bacterial wilt of banana. **Australasian Plant Pathology**, v. 35, p. 93-101, 2006.

FOUCHÉ-WEICH, J.; POUSSIER, S.; TRIGALET-DEMERY, D.; BERGER, D. & TERESA, C. Molecular identification of some African strains of *Ralstonia solanacearum* from eucalypt and potato. **Journal of General Plant Pathology**, v. 72, p. 369-373, 2006.

FREIRE, F. DAS C. O.; CARDOSO, J. E. & VIANA, F. M. P. Doenças de frutíferas tropicais de interesse agroindustrial; Brasília, DF; **Embrapa Informação Tecnológica**, 2003, 687p.

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.

FRENCH, E. R. Strategies for integrated control of bacterial wilt of potatoes. In: Hayward, A. C. & Hartman G. L. (Ed.) **Bacterial Wilt: the disease and the causative agent *Pseudomonas solanacearum***. Wallingford: CAB International, 1994, p. 199-207.

GILLINGS, M. & FAHY, P. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum* biovars 2 and N2 assessed using restriction *endonuclease* analysis of total genomic DNA. **Plant Pathology**, v. 42, n. 5, p. 744-753, 1993.

GONÇALVES, R. D. Murcha da dália e da berinjela. **O Biológico**, São Paulo, v.3, n.1, p. 27-28, 1937.

GRANADA, G. A. & SEQUEIRA, L. A. Selective Medium for *Pseudomonas solanacearum*. **Phytopathology**, v. 71, p.220, 1981.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HAYWARD, A. C. Biological and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Annual Review of Phytopathology**, v. 29, p. 65-67, 1991.

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

HAYWARD, A. C. The Hosts of *Pseudomonas solanacearum*. In: Hayward, A. C. & Hartman G. L. (Ed.) **Bacterial Wilt: the disease and the causative agent *Pseudomonas solanacearum***. Wallingford: CAB International, 1994, p. 9-24.

HAYWARD, A. C., SIQUEIRA, L., FRENCH, E. R., EL-NASHAAR, H. & NYDEGGER U. Tropical Variant of Biovar 2 of *Pseudomonas solanacearum*. **Resumos Phytopathology**, v. 82, n. 5, p. 607, 1992.

HE, L. Y.; SEQUEIRA, L. & KELMAN, A. Characteristics of isolates *Pseudomonas solanacearum* from China. **Plant Disease**, v. 67, n. 12, p. 1357-1361, 1983.

HONEYCUTT, R. J.; SOBRAL, B. W. S. & MCCLELLAND, M. tRNA intergenic spacers reveal. Polymorphism diagnostic of *Xanthomonas albilineans*. **Microbiology**, v. 141, p. 3229-3239, 1955.

HORITA, M. & TSUCHIYA, K. Genetic diversity of Japanese Strains of *Ralstonia solanacearum*. **Phytopathology**, v. 91, p. 399-407, 2001.

JANSE, J. D. A Detection method for *Pseudomonas solanacearum* in symptom less potato tubers and some data on ITS sensitivity and specificity. **EPPO Bulletin**, v. 18, p. 343-351, 1988.

JANSE, J. D. **Phytopacteriology principles and practice**. Wageningen: C.A.B. International, 2005, 366p.

JANSE, J.D.; VAN DER BELD, H.E.; ELPHINSTONE, J.; SIMPKINS, S.; TJOU-TAM-SIN, N.A. & VAN VAERENBERGH, J. Introduction to Europe of *Ralstonia solanacearum* biovar 2, race 3 in *Pelargonium zonale* cuttings. **Journal of Plant Pathology**, v. 86, 147-155, 2004.

JI, P.; ALLEN, C.; SANCHEZ-PEREZ, A.; YAO, J.; ELPHINSTONE, J. G.; JONES, J. B. & MOMOL, M. T. New Diversity of *Ralstonia solanacearum* strains associated with vegetable and ornamental crops in Florida. **Plant Disease**, v. 91, p. 185-203, 2007.

KELMAN, A. The Bacterial Wilt Caused by *Pseudomonas solanacearum*. a literature review and bibliography. Agriculture Experimental Station, **Technical Bulletin**, n. 99, 194p, 1953.

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

KIM, S. H.; OLSON, R. N.; SCHAAD, N. W. & MOORMAN, G. W. *Ralstonia solanacearum* race 3, biovar 2, the causal agent of brown rot of potato, identified in geraniums in Pennsylvania, Delaware, and Connecticut. **Plant Disease**, v. 87, 450 p., 2003.

KIMATI, H., AMORIM, L., REZENDE, J. A. M., BERGAMIN FILHO, A. & CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia**; doenças das plantas cultivadas; São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 4<sup>a</sup> ed., 2005, 663p.

KUMAR, S.; TAMURA, K. & NEI, M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Briefings Bioinformatics**, v. 5 n. 2, p. 150-163, 2004.

LAMBERT, D. C. **Agricultural Bioterrorism Protection Act of 2002**: Possession, use and transfer of biological; agents and toxins; interim and final rule. Federal Register 67 (240), 2002, p.76908-76938.

LOPES, C. A. Murchadeira da Batata. **Publicação Técnica ABBA**, Itapetininga, SP, 2005.

MAFIA, R. G. **Sintomatologia, Etiologia e Controle da Murcha Bacteriana do Eucalipto**. 2006. 88f .Tese (Doutorado), Universidade Federal Viçosa, Viçosa, MG. 2006.

MALAVOLTA JR., V. A. **Doenças Bacterianas do Tomateiro: Etiologia e Controle**. Campinas-SP, Disponível em: <<http://www.feagri.unicamp.br/tomates/pdfs/doebacter.pdf>> acesso em: 9 de fevereiro de 2010.



MALAVOLTA JR., V. A.; BERIAM, L. O. S.; ALMEIDA, I. M. G.; RODRIGUES NETO J. & ROBBS, C. F. Bactérias fitopatogênicas assinaladas no Brasil: uma atualização. **Summa Phythopatologica**, v. 24 (Suplemento Especial), p. 88, 2008.

MARTINS, O. M.; TAKATSU, A. & REIFSCHNEIDER F. J. B. Virulência de biovars I e III de *Pseudomonas solanacearum* ao tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 3, n. 13, p. 249-252, 1988.

MARTINS, O. M. & RUDOLPH K. Variability of *Ralstonia solanacearum* strains using repetitive extragenic palindromic sequences. **Bacterial Wilt Newsletter**, n. 17, p. 4-5, 2002.

MASSOL-DEYA, A. A.; ODELSON, D. A.; HICKEY, R. F. & TIEDSE, J. M. Bacterial community fingerprint al amplified 16S a 16S-23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA). In: A. D. L. Akkermans, J. D., Van Elsas and F. J. de Bruijn (Eds.), **Molecular Microbial Ecology Manual**, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1995, p. 1-8.

MORGADO, H. S.; LOPES, C. A. & TAKATSU, A. Virulência de isolados de *Pseudomonas solanacearum* a Berinjela. **Fitopatologia Brasileira**, v. 17, n. 4, p. 430-434, 1992.

NOURI, S.; BAHAR, M. & FEGAN, M. Diversity of *Ralstonia solanacearum* causing potato bacterial wilt in Iran and the first record of phylotype II/biovar 2 strains outside South America. **Plant Pathology**, v. 58, p. 243-249, 2009.

OPINA, N.; TAVNER, F.; HOLLOWAY, G.; WANG, J.; LI, T.; MAGHIRANG, R.; FEGAN, M.; HAYWARD, A.; KRISHNAPILLAI, V.; HONG, W.; HOLLOWAY, B. & TIMMIS, J. A Novel method for development of species and strain-specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas*

*solanacearum*). **Asia Pacific Journal of Molecular Biology Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 19-30, 1997.

PALLERONI, N. J.; KUNIZAWA, R.; CONTOPOULOU, R. & DOUDOROFF M. Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 23, p. 203-206, 1973.

PEREZ, A. S.; MEJIA, L.; FEGAN, M. & ALLEN C. Diversity and distribution of *Ralstonia solanacearum* strains in Guatemala and race occurrence of tomato fruit infection. **Plant Pathology**, v. 57, n. 2, p. 320-331, 2008.

PICHER, D. G.; SAUNDERS, N. A. & OWEN, R. J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. **Letters in Applied Microbiology**, v. 8, p. 151-156, 1989.

POUSSIER, S.; VANDERWALLE, P. & LUISETTI J. Genetic diversity of African and worldwide strains of *Ralstonia solanacearum* as determined by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of the *hrp* gene region. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 2184-2194, 1999.

POUSSIER, S.; TRIGALET-DEMERY, D.; VANDERWALLE, 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**, n. 146, p. 1679-1692, 2000.

PRIOR, P. & FEGAN, M.. Recent Developments in the phylogeny and classification of *Ralstonia solanacearum*. **Acta Horticulturae**, v. 695, p. 127-136, 2005.

PUN, K. B. & ADDY, S. K. Relationship between polysaccharide production and virulence in *Pseudomonas solanacearum*. **ACIAR Bacterial Wilt Newsletter**, n. 3, 1998.

REIFSCHNEIDER F. J. B. & TAKATSU A. *Pseudomonas solanacearum* no Brasil: aspectos macroepidemiológicos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 10 (Suplemento), p. 213, 1985.

ROBBS, C. F.; CRUZ, A. P. & RODRIGUES NETO, J. Algumas estratégias de controle a murcha bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*) em eucaliptos. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA. Jaguariúna, SP. **Comunicado Técnico**, nº 3, 4p., 1988.

ROBINSON, A. Serological detection of *Pseudomonas solanacearum* by ELISA. In: Hartman, G. L. & Hayward, A. C. (Eds.) **Bacterial Wilt Proceedings of an International Conference**, Kaoshiung, Taiwan, ACIAR Proceedings. 45, p. 54-61, 1993.

RODRIGUES, L. M. R.; RODRIGUES NETO, J. & MARINGONI, A. C. Preservação de *Ralstonia solanacearum* em água destilada durante 30 anos em ampolas seladas. In. XXXII Congresso Paulista de Fitopatologia, 2009, São Pedro, São Paulo. **Resumos Summa Phytopatologica**, Botucatu, v. 35, n. 1 2009, 1 CD-ROM.

RUHLF, F. J. NTSYS-PC: Numerical taxonomy and multivariate analysis system version 1.70, **Exeter Software**, Setauket, New York, 1992.

SAITOU, N. & NEI, M. The Neighbor-Joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

SANTANA, B. G.; LOPES, C. A.; ALLEN, C. & QUIRINO, B. F. Classificação em filotipos de isolados brasileiros de *Ralstonia solanacearum* da biovar 2. **Tropical Plant Pathology**, v. 33 (Suplemento), p. 93, 2008.

SEAL, S. E. & ELPHINSTONE, J. G. Advances in identification and detection of *Pseudomonas solanacearum*. In: Hayward, A. C. & Hartman, G. L. (Eds.) **Bacterial wilt**,

**the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*.** C.A.B. International, Wallingford, UK, 1994, p.35-57.

SEAL, S. E.; JACKSON, L. A.; YOUNG, J. P. W. & DANIELS, M. J. Differentiation of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas suzugii*, *Pseudomonas pickettii* and Blood Disease Bacterium by Partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for Sensitive Detection by Polymerase Chain Reaction. **Journal of General Microbiology**, v. 139, p. 1587-1594, 1993.

SCHAAD, N. W.; JONES J. B. & CHUN W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria.** 3 ed., 2001. 373p.

SILVEIRA, E. B.; GOMES, A. M. A.; MICHEREFF, S. J. & MARIANO R. L. R. Variability of *Ralstonia solanacearum* populations causing wilt on tomato in agreste of Pernambuco, Brazil. **ACIAR Bacterial Wilt Newsletter** n. 15, p. 8-10, 1998.

SILVEIRA, J. R. P.; DUARTE, V.; MORAES, G. M.; OLIVEIRA, A. M. R.; BARNI, V. & MACIEL J. L. N. Caracterização de estirpes de *Ralstonia solanacearum* isoladas de plantas de batata com murcha bacteriana, por PCR-Rep e RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 6, p.615-622, 2005.

SMITH, E. W. A Bacterial disease of the Tomato, Eggplant and Irish potato (*Bacillus solanacearum* nov. sp.) U. S. Department of Agriculture, Division of Vegetable Physiology and Pathology. **Bulletin 12**, p. 1-28, 1896.

SMITH, J. J.; OFFORD, L. C.; HOLDRNESS, M. & SADDLER G. S. Genetic diversity of *Burkholderia solanacearum* (Synonym *Pseudomonas solanacearum*) race 3 in Kenya. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 6, n. 12, p. 4263-4268, 1995.

SMITH, J. J.; OFFORD, L. C.; HOLDRNESS, M. & SADDLER G. S. Pulsedfield gel eletrophoresis analysis of *Pseudomonas solanacearum*. **European Plant Protection Organization Bulletin**, v. 25, p. 163-167, 1995.

STEVENS, F. L. & SACKETT, W. G. The Granville tobacco wilt, A preliminary Bulletin. North Carolina Agriculture Experiment Station **Bulletin 188**, p. 77-96, 1903.

SUDO, S.; OLIVEIRA, G. H. N. & PEREIRA, A. C. Eucalipto (*Eucalyptus* sp.) e Bracatinga (*Mimosa scabrella* Penth), novos hospedeiros de *Pseudomonas solanacearum* E. F. Smith. **Resumos Fitopatologia Brasileira**, v. 8, p. 631, 1983.

SWANSON, J. K.; YAO, J.; TANS-KERSTEN, J. & ALLEN, C. Behavior of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 during latent and active infection of geranium. **Phytopathology**, v. 95, p.136-143, 2005.

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

TOKESHI, H. & DUARTE M. L. R. Moko da bananeira no Território Federal do Amapá. **Summa Phytopathologica**, v.2, n. 3 p. 224-229, 1976.

USDA/APHIS/PPQ. **Pest Data Sheet**. *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2, 2003.

VILLA, J.; TSUCHIYA, K.; HORITA M.; NATURAL M.; OPINA N. & HYAKUMACHI M. DNA analysis of *Ralstonia solanacearum* and related bacteria on 282-pb PCR-Amplified Fragment. **Plant Disease**, v. 87, p. 1337-1343, 2003.

WICKER, E.; GRASSRT, L.; CORANSON-BEAUDU, R.; MIAN, D.; GUILBAUD, C.; FEGAN, M. & PRIOR, P. *Ralstonia solanacearum* Strains from Martinique (French West

Indies) exhibiting a new pathogenic potential. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 21, p. 6790-6801, 2007.

WILLIAMSON, L.; NAKOHO, 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 technique for evaluating resistance to *Pseudomonas solanacearum*. **Phytopathology**, v. 42, p. 628-634, 1952.

XU, J.; PAN, Z. C.; PRIOR, P.; XU, J. S.; ZHANG, Z.; ZHANG, H.; ZHANG L. Q.; HE L. Y. & FENG J. Genetic Diversity of *Ralstonia solanacearum* strains from China. **European Journal of Plant Pathology**, v. 125, n. 4, p. 638-650, 2009.

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; OYAIZU, H.; YANO, I.; HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T. & ARAKAWA, M. Proposal of *Burkholderia* Gen. Nov. and Transfer of Seven Species of the Genus *Pseudomonas* Homology Group II to the New Genus, With the Type Species *Burkholderia cepacia* (Palleroni & Holmes, 1981) Comb. Nov. **Microbiology and Immunology**, v. 36, p. 1251-1275, 1992.

YABUUCHI, E.; YOSHIMASA, K.; YANO, I.; HOTTA, H. & NISHIUCHI, Y. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia solanacearum* gen. nov.: Proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni e Doudoroff, 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith, 1986) comb. nov., & *Ralstonia eutropho* (Davis, 1969) comb. nov. **Microbiology and Immunology**, v. 39, n. 11, p. 897-904, 1995.

YU, Q.; ALVAREZ, A. M.; MOORE, P. H.; ZEE, F.; KIM, M. S.; SILVA DE, A.; HEPPELRY, P. R. & MING, R. Molecular Diversity of *Ralstonia solanacearum* isolated from Ginger in Hawaii. **Phytopathology**, v. 93, n. 9, p. 1124-1130, 2003.

ZOCCOLI, D. M.; TOMITA, C. K. & UESUGI C, H. Ocorrência de murcha bacteriana em helicônias e musácea ornamental no Distrito Federal. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, n.1, p.45-46, 2009.