



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL  
DE PERNAMBUCO**  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM FITOPATOLOGIA**

**Dissertação de Mestrado**

**DIVERSIDADE DE ISOLADOS DE *Ralstonia  
solanacearum* DAS REGIÕES NORTE E  
NORDESTE DO BRASIL**

**Jéssica Rodrigues da Silva**

**Recife - PE  
2014**

**JÉSSICA RODRIGUES DA SILVA**

**DIVERSIDADE DE ISOLADOS DE *Ralstonia solanacearum* DAS REGIÕES NORTE E NORDESTE DO BRASIL**

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

**COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:**

Orientadora: Professora Dra. Rosa de Lima Ramos Mariano

Coorientadora: Professora Dra. Elineide Barbosa de Souza

Coorientador: Dr. Adriano Márcio Freire da Silva

**RECIFE-PE  
FEVEREIRO – 2014**

Ficha catalográfica

S586d Silva, Jéssica Rodrigues da  
Diversidade de isolados de *Ralstonia solanacearum* das  
regiões norte e nordeste do Brasil / Jéssica Rodrigues da  
Silva. – Recife, 2014.  
48 f.: il.

Orientadora: Rosa de Lima Ramos Mariano.  
Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade  
Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Agronomia,  
Recife, 2014.  
Referências.

1. Murcha bacteriana 2. Diversidade genética  
3. Filotipo 4. Sequevar I. Mariano, Rosa de Lima Ramos,  
orientadora II. Título

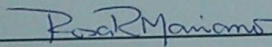
CDD 632

**DIVERSIDADE DE ISOLADOS DE *Ralstonia solanacearum* DAS REGIÕES NORTE E NORDESTE DO BRASIL**

**JÉSSICA RODRIGUES DA SILVA**

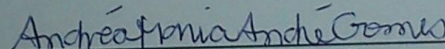
Dissertação apresentada e aprovada pela Banca Examinadora em 28 de fevereiro de 2014.

**ORIENTADORA:**

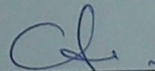


Prof.<sup>a</sup>. Dra. Rosa de Lima Ramos Mariano

**EXAMINADORES:**



Prof.<sup>a</sup>. Dra. Andréa Maria André Gomes  
(Centro Universitário Maurício de Nassau - UNINASSAU)



Prof. Dr. Sami Jorge Michereff  
(PPGF- Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE)



Dra. Kátia Cilene Felix  
(Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE)

**RECIFE-PE**

**FEVEREIRO – 2014**

“O maior líder é aquele que reconhece sua pequenez, extrai força de sua humildade e experiência da sua fragilidade.”  
(Augusto Cury)

Aos meus pais José Aauto da Silva Júnior e Luzanira Rodrigues da Silva, e meus irmãos, Thaysa e Gabriel pelo imenso amor, carinho e apoio em todas as etapas da minha vida,

DEDICO

Ao meu amado noivo Marcondes Araújo da Silva que conheci no início de minha vida acadêmica, pelo incentivo, compreensão e por sempre estar ao meu lado,

OFEREÇO

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar o fôlego de vida e forças para que eu pudesse alcançar mais uma vitória, além de tornar meus dias mais agradáveis até nos momentos difíceis.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco pela oportunidade da realização do curso de Mestrado em Fitopatologia.

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

À Profa. Dra. Rosa de Lima Ramos Mariano pela excelente orientação, acolhimento desde o primeiro dia em que cheguei ao laboratório, ensinamentos, apoio, confiança, conselhos e além de tudo, muita paciência durante esses dois anos.

À Profa. Dra. Elineide Barbosa de Souza pela orientação, atenção e incentivo durante a execução dessa dissertação.

Ao Dr. Adriano Márcio Freire da Silva pelos conhecimentos repassados, observações e sugestões que foram fundamentais para a compreensão deste estudo.

À Dra. Kátia Cilene Félix pelo exemplo de competência, profissionalismo e por compartilhar experiências.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, pelos ensinamentos e conhecimentos compartilhados.

Meu grande agradecimento à equipe do Laboratório de Fitobacteriologia (LAFIBAC), Edilaine Melo, Mirtis Midiam, Walkiria Alves, Tássia Camila, Myrzânia Guerra, Greecy Mirian, Marco Aurélio, Claudeana Souza, Willams Oliveira, Conrado Queiroz, Alexandre Xavier, Júnior, Elias Silva e Meridiana Araújo, pelo ajuda no laboratório e por me proporcionarem dias melhores e divertidos.

À Dra. Cristiane Domingos da Paz que me iniciou na pesquisa, por toda experiência repassada e amizade.

Aos meus amigos e colegas do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia Mayumi, Kamila, Susan e João pelo companheirismo e pelos momentos de descontração.

A Luiz Coelho (Lula) e a Sr. Luís pelo apoio na realização dos trabalhos executados em casa de vegetação.

Aos funcionários Darcy Martins e Romildo pela atenção e ajuda ao longo do curso.

Enfim, agradeço a todos que participaram dessa jornada, cujo apoio, incentivo e torcida foram fundamentais para a minha vitória.

## SUMÁRIO

RESUMO GERAL .....	ix
GENERAL ABSTRACT .....	x
INTRODUÇÃO GERAL .....	11
Importância da murcha bacteriana.....	12
Ciclo da doença .....	13
Aspectos bioquímicos e taxonômicos.....	14
Medidas de controle.....	17
Referências bibliográficas .....	18
CAPÍTULO II.....	23
DIVERSIDADE DE ISOLADOS DE <i>Ralstonia solanacearum</i> , DAS REGIÕES NORTE E NORDESTE DO BRASIL .....	24
Resumo .....	24
Material e métodos .....	27
Descrição dos isolados e patogenicidade.....	27
Identificação dos isolados e determinação dos filotipos .....	27
Perfil de utilização de carboidratos e sensibilidade a substâncias inibitórias.....	28
Patogenicidade a batata, pimentão e tomate .....	29
Análises filogenéticas .....	29
Resultados.....	30
Patogenicidade, identificação dos isolados e determinação de filotipo.....	30
Perfil de utilização de carboidratos e sensibilidade a substâncias inibitórias.....	31
Patogenicidade a batata, pimentão e tomte.....	31
Análises filogenéticas .....	31
Discussão .....	32
Agradecimentos .....	35
Literatura citada.....	35
CONCLUSÕES GERAIS.....	48



## RESUMO GERAL

A murcha bacteriana, causada por *Ralstonia solanacearum*, tem importância mundial em função dos riscos econômicos que representa, da ampla gama de hospedeiros e do difícil controle. O objetivo deste trabalho foi analisar a diversidade bioquímica, patogênica e filogenética de isolados de *R. solanacearum* oriundos das regiões Norte e Nordeste do Brasil. Foram utilizados um total de 99 isolados obtidos de tomate, pimentão, berinjela, jiló, batata, banana, pimenta de cheiro, pepino e maria-pretinha. Os isolados foram caracterizados como filotipo I (71,7%) e II (28,3%), sendo que na região Norte só foi encontrado o filotipo II. O perfil bioquímico de 47 isolados, selecionados com base na origem geográfica, hospedeiro e filotipo, foi obtido através do sistema Biolog Gen III e evidenciou alta diversidade fenotípica nos filotipos I e II. Em geral, a maioria dos isolados foi patogênica a pelo menos dois, dos três hospedeiros inoculados (batata, pimentão e tomate), indicando baixa diversidade. Na análise filogenética, a árvore do gene *egl* foi altamente congruente com a árvore construída com a sequência concatenada dos genes *egl* e *mutS* pelo método de Máxima Verossimilhança. As sequevares I-17, I-18, IIA-39, IIA-53 e IIB-1 foram observadas em ambas as árvores. No entanto, três grupos do filotipo IIA não se agruparam com nenhuma das sequevares até então descritas, sugerindo-se que sejam criadas três novas sequevares IIA-54, IIA-55 e IIA-56, ampliando a diversidade do complexo *R. solanacearum*. Foram demonstradas baixa diversidade genética no filotipo I no Nordeste e alta diversidade genética no filotipo II nas regiões Norte e Nordeste.

**Palavras-chave:** diversidade bioquímica, diversidade genética, filogenia, murcha bacteriana.

## GENERAL ABSTRACT

Bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* has global importance, due to the economic risks posed, the broad host range and the difficult to control. The objective of this study was to analyze the biochemical, pathogenic and phylogenetic diversity of *R. solanacearum* strains obtained from the northern and northeastern regions of Brazil. A total of 99 strains were obtained from: tomato, sweet pepper, eggplant, gilo, potato, banana, hot pepper, cucumber and black nightshade. The strains were characterized as phylotypes I (71,7%) and II (28,3%), and in the northern region was only found phylotype II. The biochemical profile of 47 strains chosen based on geographical origin, host and phylotype was acquired from the Biolog Gen III system and showed high phenotypic diversity in phylotypes I and II. In general, most of the strains were pathogenic to at least two of the three inoculated hosts (potato, pepper and tomato) which indicated low diversity. In the phylogenetic analysis, the tree of the *egl* gene was highly congruent with the tree constructed with concatenated sequence of *egl* and *mutS* genes by the method of Maximum Likelihood. The sequevars I-17, I-18, IIA-39, IIA-53 and IIB-1 were observed in both trees. However, three groups of the phylotype IIA do not grouped with any of sequevars hitherto described, suggesting the creation of three new sequevars named IIA-54, IIA-55 and IIA-56, increasing the diversity of the *R. solanacearum* complex. This work showed that phylotype I had low genetic diversity in northeast region, whereas phylotype II presented high genetic diversity in north and northeast regions.

**Keywords:** bacterial wilt, biochemical diversity, phylogeny, genetic diversity.

## **CAPÍTULO I**

### **Introdução Geral**

## DIVERSIDADE DE ISOLADOS DE *Ralstonia solanacearum* DAS REGIÕES NORTE E NORDESTE DO BRASIL

### Importância da murcha bacteriana

A murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. é considerada uma das principais e prejudiciais doenças de plantas. Esta importância se deve ao difícil controle, ampla distribuição geográfica e grande número de espécies afetadas, atingindo mais de 450 plantas hospedeiras, distribuídas em aproximadamente 54 famílias botânicas, com perdas difíceis de quantificar (WICKER, 2007). Dentre essas espécies, encontram-se algumas solanáceas economicamente importantes como batata (*Solanum tuberosum* L.), berinjela (*Solanum melongena* L.), fumo (*Nicotiana tabacum* L.), pimentão (*Capsicum annuum* L.) e tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (BRINGEL, 2002). No entanto, espécies de outras famílias também são hospedeiras deste patógeno, tais como, banana (*Musa* spp.), amora (*Morus alba* L.) e gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) (XU, 2009).

No Brasil, os primeiros relatos ocorreram em 1922, em plantas de fumo e batata, no Rio Grande do Sul (TAKATSU; LOPES 1997). No entanto, a murcha bacteriana ocorre em todas as regiões, principalmente no Norte, Nordeste (COSTA; FERREIRA; LOPES 2007) e em algumas áreas produtoras de terras baixas da região sudeste, devido à predominância de altas temperaturas e umidade (BERIAM, 2007). Nessas regiões, a perda na produção é muito elevada, podendo chegar a 100% e condenar os campos, principalmente em plantios sucessivos, devido à capacidade da bactéria sobreviver no solo por longo período (LOPES; DUVAL, 2007). *R. solanacearum* está presente na maioria dos solos brasileiros. Em tomate, a doença é encontrada em todo o país, causando grandes prejuízos. Em batata, a murcha bacteriana constitui uma das mais importantes doenças e quando não se utiliza batata-semente certificada, as perdas podem chegar a 50% da produção. Em pimentão, a murcha é fator limitante para o cultivo na região amazônica e em áreas de baixa altitude na região Nordeste (MARIANO et al., 2001).

Em Pernambuco, a murcha bacteriana restringe o cultivo de tomate, pimentão e berinjela, inclusive na mesoregião da Mata do estado (MARIANO et al., 1989). Atualmente, a doença tem causado grandes prejuízos econômicos nos municípios produtores das mesoregiões do Agreste (Bezerros, Camocim de São Félix, Caruaru, Garanhuns e Sairé) e da Mata (Chã Grande) (GARCIA et. al., 2013).

## Ciclo da Doença

*Ralstonia solanacearum* é uma bactéria habitante do solo e penetra através de ferimentos existentes na raiz do hospedeiro. Em menos de quatro horas invade os espaços intercelulares do córtex da raiz e em dois a três dias coloniza inteiramente esses espaços e o parênquima vascular (LIU et al., 2005). O patógeno se multiplica rapidamente sempre em direção ao xilema, de onde atinge todas as partes da planta; é levada juntamente com a água e nutrientes, atingindo uma densidade populacional superior a  $10^9$  UFC  $g^{-1}$  de haste. Em decorrência da colonização, ocorre a obstrução dos vasos, causada pelo acúmulo de exopolissacarídeo, que é considerado o principal fator de virulência deste patógeno. Assim, o fluxo de seiva pode ser parcial ou totalmente bloqueado, impedindo que a água e nutrientes absorvidos pelo sistema radicular supram adequadamente a parte aérea da planta (HIKICHI et al., 2007; AMORIM et al., 2011).

Em consequência da colonização, o sintoma externo é evidenciado por murcha sem alteração da coloração das folhas, iniciando pelas mais velhas e progredindo para as mais novas. Com o progresso da doença, os tecidos do caule e do ponteiro se tornam flácidos, seguindo-se a murcha permanente, seca das folhas, caules, ramos e finalmente, a morte da planta. Os sintomas internos são observados quando um corte transversal ou longitudinal do caule é realizado, principalmente na parte basal, onde é possível observar a descoloração do xilema. O escurecimento dos vasos é atribuído ao transporte de substâncias resultantes da oxidação de fenóis, que originam composto do tipo melanina. Ao ser realizado o teste do copo, observa-se a exsudação de pus, indicando a presença da bactéria nos vasos infectados (AMORIM et al., 2011).

Além dos sintomas da parte aérea acima descritos, na cultura da batata os tubérculos podem ou não apresentar uma leve depressão e necrose na região do estolão com escurecimento de gemas que, geralmente, exsudam pus bacteriano. Em corte transversal, o tubérculo apresenta escurecimento do sistema vascular e, aplicando-se uma rápida pressão, ocorre exsudação bacteriana. Estes sintomas podem ser seguidos de podridão e são praticamente os únicos observados em regiões de clima temperado, onde a murcha característica da parte aérea da planta dificilmente ocorre (PÉROMBELON, 1996).

A disseminação do patógeno a curta distância ocorre através da movimentação de solo, água de irrigação em encostas, máquinas agrícolas e utilização de ferramentas contaminadas nas práticas culturais, ocasionando a introdução da murcha bacteriana em novas áreas. Neste processo de disseminação, a capacidade de sobrevivência da bactéria no solo, água e restos de

cultura, a presença de infecções latentes, bem como os hospedeiros alternativos e plantas invasoras têm influência fundamental (COUTINHO, 2005; HAYWARD, 1994). A disseminação a longa distância ocorre principalmente pelo transporte de material vegetal infectado.

### **Aspectos Bioquímicos e Taxonômicos**

O gênero *Ralstonia* pertence ao reino Procariotae, domínio Bacteria, divisão Proteobacteria, classe  $\beta$ -Proteobacteria, ordem Burkholderiales, família Burkholderiaceae (EUZÉBY, 2013). No entanto, segundo Kado (2010) este gênero pertence à família Ralstoniaceae. *Ralstonia solanacearum* é uma bactéria Gram-negativa, apresenta forma de bastonete, reto ou levemente curvo, com aproximadamente  $0,5 \times 1,5 \mu\text{m}$ , é aeróbica e não forma esporos. Alguns isolados podem produzir pigmentos marrons em meio de cultura contendo a tirosina, mas não produz pigmentos fluorescentes. Isolados virulentos não apresentam flagelos, enquanto os isolados avirulentos têm alta motilidade sendo providos de um a quatro flagelos polares. Frequentemente pode reduzir nitrato a nitrito com produção de gás, mas não hidrolisa o amido. Realiza fraca hidrólise de gelatina e não utiliza arginina ou betaina como fonte de carbono. Alguns isolados de *R. solanacearum* acumulam poli- $\beta$ -hidroxi-butirato como fonte de carbono, podem apresentar tolerância a sais e um bom crescimento em temperaturas entre 25 e 35°C (MEHAN et al., 1994).

A nomenclatura de *R. solanacearum* tem sofrido grandes mudanças (HAYWARD, 1991; LOPES; REISFSCHNEIDER, 1999). Em 1896, tendo sido isolada a partir de plantas de tomateiro infectadas provenientes de Ocean Springs (Mississippi), foi descrita pela primeira vez por Erwin F. Smith que a denominou *Bacillus solanacearum* Smith. Em 1914 foi denominada *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith, até que em 1992 Yabuuchi et al. (1992) propuseram o novo gênero *Burkholderia*, para o qual transferiram sete espécies do gênero *Pseudomonas*, entre elas *P. solanacearum*, designada como *Burkholderia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. Entretanto em 1995, com base na análise molecular da sequência da região 16S do rRNA e em análises quimiotaxonômicas, passou a ser denominada *R. solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. (YABUUCHI et al., 1995).

Esta bactéria é caracterizada pela alta diversidade de fenótipos e genótipos e era classificada anteriormente em nível infraespecífico em cinco raças de acordo com a gama de hospedeiros (HE et al.1983) e cinco biovars em relação as características bioquímicas (HAYWARD, 1964). Nesta classificação, a raça 1 afeta o maior número de culturas

incluindo solanáceas tais como, batata, tomate, pimentão, berinjela, fumo e plantas de outras famílias, entre as quais, amendoim (*Arachis hypogaea* L.), oliveira (*Olea europaea* L.), bananeira ornamental (*Musa* sp.), ave do paraíso (*Strelitzia reginae* Banks) e em alguns locais, helicônia (*Heliconia* spp.). A raça 2 afeta bananeira triplóide (banana comestível e banana subgrupo Terra ou “plátano”) e helicônias (HAYWARD, 1994), enquanto a raça 3 é considerada específica da batata e ocasionalmente tomate, mas não outras culturas (BUDDENHAGEN et al., 1962). As raças 4 e 5 infectam o gengibre e a amoreira, respectivamente (HAYWARD, 1994). A classificação de acordo com a biovar é definida através da utilização de açúcares (lactose, maltose e celobiose) e álcoois (manitol, sorbitol e dulcitol) como única fonte de carbono e a formação de ácidos a partir destes carboidratos, além da produção de nitrito e gás a partir de nitrato, sendo classificados os biovars 1, 2, 3, 4 e 5 (HAYWARD, 1964; HE et al., 1983). Ambas as classificações foram amplamente utilizadas por sua simplicidade e praticidade, mas não refletem a heterogeneidade dos isolados de *R. solanacearum* (PINHEIRO, 2011).

Com relação à raça 2 causando murcha bacteriana em bananeira triplóide e helicônia na América Central e do Sul, French e Sequeira (1970) definiram cinco grupos ou ecotipos relacionados à ecologia do patógeno: (1) Grupo A, proveniente da Bacia Amazônica; (2) Grupo SFR (small, fluidal and round), transmitido por insetos; (3) Grupo B, de banana; (4) Grupo D, causando distorção; e (5) Grupo H, de helicônias. Os ecotipos A, SFR, B e D são patogênicos à bananeira triplóide; e H apenas à banana subgrupo Terra. SFR é transmitido por insetos e B é habitante do solo. SFR, A e B são grupos mais agressivos que o D. Todos são naturalmente patogênicos a *Musa* sp. e, quando inoculados por injeção no caule, são patogênicos ao tomate e a outras solanáceas, mas nunca foram isolados de solanáceas naturalmente murchas no campo (FEGAN; PRIOR, 2005).

Devido a grande variabilidade infraespecífica, *R. solanacearum* tem sido considerada um complexo de espécies, que é definido como um grupo de isolados proximamente relacionados, cujos membros individuais podem representar mais de uma espécie. Dois outros organismos relacionados foram definidos através da análise de sequências da região 16S rRNA e participam desse complexo de espécies, a blood disease bacterium que ocorre na Indonésia e *R. syzygii* (Roberts et al.) Vaneechoutte et al., agente causal da “doença de Sumatra do cravo da Índia”, com ocorrências em Java e Sumatra (FEGAN; PRIOR, 2005).

Com a aplicação da técnica de RFLP (polimorfismos do comprimento de fragmentos de restrição), Cook e Sequeira (1994) e Cook et al. (1989) classificaram *R. solanacearum* em: divisão 1, que compreende isolados principalmente da Ásia e divisão 2, que abrange isolados

obtidos das Américas. Vários outros trabalhos empregando métodos moleculares têm confirmado essa dicotomia dentro do complexo de *R. solanacearum*. O sequenciamento da região espaçadora intergênica (ITS) do rRNA (16S-23S) e dos genes *mutS* (reparo de DNA) e *egl* (endoglucanase) tem apoiado a existência dessas duas divisões e de grupos originários da Indonésia e da África. Para representar melhor a diversidade desse complexo de espécies, Fegan e Prior (2005) propuseram uma nova classificação hierárquica, a partir dos sequenciamentos mencionados, na qual isolados das cinco raças foram subdivididos em quatro níveis taxonômicos: espécie, filotipo, sequevares e clones. A classificação em filotipo é analisada com base na região ITS e determinada por PCR-multiplex, estando correlacionada com a origem geográfica dos isolados.

O complexo de espécies de *R. solanacearum* é subdividido em quatro filotipos, onde o filotipo I, que corresponde a divisão 1, é encontrado principalmente na Ásia; o filotipo II que corresponde a divisão II é proveniente das Américas; o filotipo III, oriundo da África e ilhas vizinhas; e o filotipo IV, proveniente principalmente da Indonésia, mas também encontrado na Austrália e Japão. O filotipo IV é constituído por duas espécies intimamente relacionadas: a blood disease bacterium, que causa doença somente em bananeiras na Indonésia e *R. syzygii*, que causa a doença de Sumatra do cravo da Índia, sendo transmitida pela cigarrinha *Hindola fulva* Baker, na Sumatra e *H. striata* Maa, em Java (EDEN-GREEN; ADHI, 1986).

O sequenciamento dos genes *hrpB* (hipersensibilidade e patogenicidade) e *egl* tornou possível separar cada filotipo em sequevares. Um sequevar é definido como um grupo de isolados com uma sequência altamente conservada dentro de uma região sequenciada e atualmente já foram identificados 52 sequevares (FEGAN; PRIOR, 2005; XU et al., 2009).

A filogenia baseada na sequência parcial do gene *egl* para o complexo de espécies de *R. solanacearum* é relatada como um bom indicador do relacionamento entre isolados (FEGAN; PRIOR, 2006) e mostrou ser congruente com a análise filogenética baseada na hibridização do DNA em microarranjos (GUIDOT et al., 2007). A sequência do gene *egl* tem sido utilizada para determinar a relação filogenética entre isolados de *R. solanacearum*. Este gene existe em cópia única no genoma, é conservado e presente em todos os isolados testados até o momento. Além disso, confere uma importante característica de virulência e tem suficiente variabilidade na sequência de nucleotídeos para caracterizar a diversidade de isolados brasileiros de *R. solanacearum* (FEGAN; PRIOR, 2005; ROBERTS et al., 1988).

A endoglucanase (*egl*) é uma enzima pertencente à família da celulase e tem papel importante na patogenicidade da bactéria (KADO, 2010). Mutantes defectivos em *egl* são mais lentos em causar sintomas do que os isolados que expressam o gene (DENNY et al.,



1990; ROBERTS et al., 1988). As evidências sugerem que a lise da parede celular, pelo menos nos estágios iniciais, envolve a degradação da pectina e hemiceluloses, com a consequente exposição das microfibrilas da celulose à ação das celulases (AMORIM et al., 2011).

Wicker et al. (2007) compararam filotipos detectados entre isolados de *R. solanacearum* obtidos entre 1989-2003 nas Antilhas Francesas e isolados de referência utilizando PCR-multiplex e sequenciamento dos genes *mutS* e *egl*. Dentre estes isolados, 119 obtidos da Martinica a partir de antúrio, cucurbitáceas, *Heliconia* sp. e tomate foram classificados como filotipo II/4NPB, que significa não patogênico a banana. No entanto, as árvores filogenéticas os agruparam com aqueles comumente encontrados em banana causando Moko. Esses isolados foram altamente patogênicos a berinjela, pimentão e tomate (inclusive a linhagem resistente ‘Hawai 7996’) e causaram infecção latente em banana comprida. O filotipo II/4NPB constituiu assim uma nova variante patogênica que poderá se tornar prevalente no Caribe e América Central (WICKER et al., 2007). Este estudo demonstrou a sensibilidade do sistema filotipo como ferramenta de diagnose (BROWN, 2009) e comprovou o enorme potencial patogênico de *R. solanacearum*. Além disso, evidenciou a necessidade da continuidade e aprofundamento dos estudos etiológicos e epidemiológicos com este patógeno no Brasil, a exemplo dos realizados por Costa et al. (2007) e Pinheiro et al. (2011).

### **Medidas de controle**

Algumas medidas preventivas de controle da murcha bacteriana têm sido recomendadas, tais como: manejo da água do solo para evitar encharcamento; evitar ferimentos por nematóides, insetos ou implementos agrícolas; evitar movimentação a partir de focos da doença para outras áreas; eliminar plantas doentes, voluntárias infectadas e invasoras da família solanáceas; e fazer rotação de culturas por no mínimo um ano, com gramíneas (LOPES; QUEZADO SOARES, 2001). Entretanto, após a ocorrência da epidemia, as estratégias possíveis de desinfestação e modificações do solo, controle biológico e indução de resistência, apresentam baixa eficácia. O melhoramento para a resistência à murcha bacteriana é considerado uma medida eficiente de controle. No entanto, a quebra da resistência ocorre frequentemente devido a plasticidade genômica e fenotípica dentro do complexo de espécies *R. solanacearum* (TOUKAM et al., 2009). Por exemplo, linhagens de tomateiro consideradas resistentes à murcha bacteriana em uma determinada área geográfica, poderão ser suscetíveis em outra área devido à variações das populações do patógeno ali existente. Portanto, a

eficiência da resistência genética é altamente dependente da interação entre hospedeiro, patógeno e condições ambientais.

O conhecimento da diversidade de populações de *R. solanacearum* é fundamental para a adequação de medidas de controle ou para o desenvolvimento de novas estratégias baseadas na resistência de germoplasma (ALBUQUERQUE, 2013). Desta forma, o objetivo deste estudo foi caracterizar a diversidade patogênica, bioquímica e filogenética de populações de *R. solanacearum* obtidas de solanáceas das regiões Norte e Nordeste do Brasil.

### **Referências bibliográficas**

ALBUQUERQUE, G. M. R. **Diversidade de isolados brasileiros de *Ralstonia solanacearum* raça 2**. 2013, 62f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2013.

AMORIM, L.; REZENDE, M. A. J.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. v.1, Agronômica Ceres, 2011. 704 p.

BERIAM, L. O. S. Doenças bacterianas em hortaliças. **O Biológico**. São Paulo, v. 69, n. 2, p. 81-84, 2007.

BRINGEL, J. M.M. **Caracterização bioquímica, patogênica e molecular de isolados de *Ralstonia solanacearum* biovar 2 de batata e berinjela**. 2002. 103 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escolar Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

BROWN, D. *Ralstonia solanacearum* and bacterial wilt in the post-genomic era. In: JACKSON, R.W. (Ed.) **Plant pathogenic bacteria: genomics and molecular biology**. Norfolk: Caister Academic Press, 2009. p. 175-202.

BUDDENHAGEN, I. W.; SEQUEIRA, L.; KELMAN, A. Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 52, n. 7, p. 726, 1962.

COOK, D.; BARLOW, E.; SEQUEIRA, L. Genetic diversity of *Pseudomonas*

*solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphisms with DNA probes that specify virulence and the hypersensitive response. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 2, n. 3, p. 113-121, 1989.

COOK, D.; BARLOW, E.; SEQUEIRA, L. DNA probes as tools for the study of host pathogen evolution: the example of *Pseudomonas solanacearum*. In: HENNEKE, H.; VERMA, D. P. S. (Eds.). **Advances in molecular genetics of plant-microbe interactions**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. p. 103-108.

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

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

COUTINHO, T. A. Introduction and prospectus on the survival of *R. solanacearum*. In: ALLEN, C.; PRIOR, P.; HAYWARD, A. C. (Eds.). **Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex**. St. Paul: APS Press, 2005. p. 29-38.

EUZÉBY, J. P. **List of prokaryotic names with standing in nomenclature**. 2009. Disponível em: < <http://www.bacterio.cict.fr/classifphyla.html>>. Acesso em: 26 Mar. 2014.

FEGAN, M.; PRIOR, P. Diverse members of the *Ralstonia solanacearum* species complex cause bacterial wilt of banana. **Australasian Plant Pathology**, Rockhampton, v. 35, n. 2, p. 93-101, 2006.

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

FRENCH, E. R.; SEQUEIRA, L. Strains of *Pseudomonas solanacearum* from Central and South America: a comparative study. **Phytopathology**, St. Paul, v. 60, n. 3. p. 506-512, 1970.

GARCIA, A. L.; LIMA, W. G.; SOUZA, E. B.; MICHEREFF, S. J.; MARIANO, R. L. R. Characterization of *Ralstonia solanacearum* causing bacterial wilt bell pepper in the state of Pernambuco, Brazil. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 95, n. 2, p. 237-245, 2013.

GUIDOT, A.; PRIOR, P.; SHOENFELD, J.; CARRERE, S.; GENIN, S.; BOUCHER, C. Genomic structure and phylogeny of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from gene distribution analysis. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 189, n. 2, p. 377-387, 2007.

HAYWARD, A. C. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 27, n. 2, p. 265-277, 1964.

HAYWARD, A. C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 29, n. 1, p. 65-87, 1991.

HAYWARD, A. C. The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. In: HAYWARD, A. C.; HARTMAN, G. L. (Eds.). **Bacterial wilt - the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum***. Wallingford: CAB International, 1994. p. 9-24.

HE, L. Y.; SEQUEIRA, L.; KELMAN, A. Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 67, n. 12, p. 1357-1361, 1983.

HIKICHI, Y.; YOSHIMOCCHI, T.; TSUJIMOTO, S.; SHINOHARA, R.; NAKAHO K.; KANDA, A.; KIBA, A.; OHNISHI, K. Global regulation of pathogenicity mechanism of *Ralstonia solanacearum*. **Plant Biotechnology**, Sheffield, v. 24, n. 1, p. 149-154, 2007.

KADO, C. **Plant bacteriology**, St. Paul: APS Press, 2010. 336 p.

LIU, H. L.; ZHANG, S. P.; SCHELL, M. A.; DENNY, T. P. Pyramiding, unmarked deletions in *Ralstonia solanacearum* shows that secreted proteins in addition to plant cell-wall

degrading enzymes contribute to virulence. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 18, n. 12, p. 1296-1305, 2005.

LOPES C. A.; DUVAL A. M. Q. Epidemiologia e controle das bacterioses das hortaliças. In: ZAMBOLIM L; LOPES C.A; PICANÇO M.C; COSTA H.(eds). **Manejo integrado de doenças e pragas: hortaliças**. Viçosa: Editora UFV, 2007. 502 p.

LOPES, C. A.; QUEZADO-SOARES, A. M. **Doenças bacterianas das hortaliças - diagnose e controle**. Brasília: Embrapa - CNPH, 2001. 72 p.

LOPES, C. A.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. Manejo integrado das doenças da batata. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte v. 20, n.197, p. 56-60, 1999.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; ASSIS, S. M. P.; GOMES, A. M. A.; OLIVEIRA, I. S.; NASCIMENTO, A. R. Diagnose e manejo de fitobacterioses de fitobacterioses de importância para o Nordeste brasileiro. In: MICHEREFF, S. J.; BARROS, R. (Eds.). **Proteção de plantas na agricultura sustentável**. UFRPE, Recife: Imprensa Universitária, 2001. 368 p.

MARIANO, R. L. R.; MELO, R. A. G.; HOLANDA, V. T.; CABRAL, G. B.; SILVA, M. S. S. G. Levantamento das fitobacterioses do estado de Pernambuco no biênio 1987-1988. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 14, n. 2, p. 158, 1989.

MEHAN, V. K.; LIAO, B. S.; TAN, Y. J.; ROBINSON-SMITH, A.; McDONALD, D.; HAYWARD, A. C. **Bacterial wilt of groundnut**. Patancheru: Internacional Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, 1994. 28 p. (ICRISAT Information Bulletin, 35).

NEI, M.; KUMAR, Molecular evolution and phylogenetics. New York: Oxford University Press, 2000. 333p.

PEROMBELON, M. How do potato growers stop brown rot? **Potato Review**, Norfolk, v. 6, p. 18-21, 1996.

PINHEIRO, C. R.; AMORIM, J. A. E.; DINIZ, L. E. C.; SILVA, A. M. F.; TALAMINI, V.; SOUZA JÚNIOR, M. T. Diversidade genética de isolados de *Ralstonia solanacearum* e caracterização molecular quanto a filotipos e sequevares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.46, n.6, p.593-602, 2011.

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**, Washington, v. 73, n. 21, p. 6790-6801, 2007.

TAKATSU, A.; LOPES, C. A.; Murcha bacteriana em hortaliças: avanços científicos e perspectivas de controle. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 15, n. 3, p. 170-177, 1997.

TOUKAM, M. S.; CELLIER, G.; WICKER, E.; GUILBAUD, C.; KAHANE, R.; ALLEN, C.; PRIOR, P. Broad diversity of *Ralstonia solanacearum* strains in Cameroon. **Plant Disease**, St. Paul, v. 93, n. 11, p. 1123-1130, 2009.

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; OYAIZU, H.; YANO, I.; HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T.; ARAKAWA, M. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov. – Proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff, 1973) com nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith, 1896) com nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis, 1969) comb. nov. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v. 39, n. 11, p.897-904, 1995.

YABUUCHI, E.; KOSARO, Y.; OYIZU, 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 and Holmes, 1981) comb. nov. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v. 36, n. 12, p. 1251-1275, 1992.

XU, J.; PAN, Z. C.; 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**, Dordrecht, v. 125, n. 4, p.641–653, 2009.

## CAPÍTULO II

---

# DIVERSIDADE DE ISOLADOS DE *Ralstonia solanacearum* DAS REGIÕES NORTE E NORDESTE DO BRASIL

1 **Diversidade de isolados de *Ralstonia solanacearum* das regiões Norte e Nordeste do**  
2 **Brasil**

3  
4 **Jéssica R. Silva, Adriano M. F. Silva, Kátia C. S. Felix, Edilaine A. Melo, Marco A. S.**  
5 **Gama, Walkíria A. Silva,** Laboratório de Fitobacteriologia, Departamento de Agronomia,  
6 Universidade Federal Rural de Pernambuco; **Elineide B. Souza,** Departamento de Biologia,  
7 Universidade Federal Rural de Pernambuco; e **Rosa L. R. Mariano,** Laboratório de  
8 Fitobacteriologia, Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco,  
9 Av. Dom Manoel Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP 52171-900, Recife-PE, Brasil.

10  
11 **Resumo**

12  
13 A murcha bacteriana, causada por *Ralstonia solanacearum*, tem importância mundial em  
14 função dos riscos econômicos que representa, da ampla gama de hospedeiros e do difícil  
15 controle. O objetivo deste trabalho foi analisar a diversidade bioquímica, patogênica e  
16 filogenética de isolados de *R. solanacearum* oriundos das regiões Norte e Nordeste do Brasil.  
17 Foram utilizados um total de 99 isolados obtidos de tomate, pimentão, berinjela, jiló, batata,  
18 banana, pimenta de cheiro, pepino e maria-pretinha. Os isolados foram caracterizados como  
19 filotipo I (71,7%) e II (28,3%), sendo que na região Norte só foi encontrado o filotipo II. O  
20 perfil bioquímico de 47 isolados, selecionados com base na origem geográfica, hospedeiro e  
21 filotipo e obtido através do sistema Biolog Gen III, evidenciou alta diversidade fenotípica nos  
22 filotipos I e II. Em geral, a maioria dos isolados foi patogênica a pelo menos dois, dos três  
23 hospedeiros inoculados (batata, pimentão e tomate), indicando baixa diversidade. Na análise  
24 filogenética, a árvore do gene *egl* foi altamente congruente com a árvore construída com a  
25 sequência concatenada dos genes *egl* e *mutS* pelo método de Máxima Verossimilhança. As  
26 sequevares I-17, I-18, IIA-39, IIA-53 e IIB-1 foram observadas em ambas as árvores. No  
27 entanto, quatro grupos do filotipo IIA não se agruparam com nenhuma das sequevares até  
28 então descritas, sugerindo-se que sejam criadas três novas sequevares IIA-54, IIA-55 e IIA-  
29 56, ampliando a diversidade do complexo *R. solanacearum*. Foram demonstradas baixa  
30 diversidade genética no filotipo I no Nordeste e alta diversidade genética no filotipo II nas  
31 regiões Norte e Nordeste.

32  
33 **Palavras-chave:** diversidade bioquímica, diversidade genética, filogenia, murcha bacteriana.



34 A murcha bacteriana, causada por *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. é  
35 uma das doenças de plantas mais importantes e prejudiciais devido ao difícil controle e à  
36 ampla distribuição geográfica no Brasil e no mundo (20). Esta doença afeta mais de 450  
37 espécies de plantas em regiões tropicais, subtropicais e temperadas. Espécies pertencentes à  
38 família das solanáceas são consideradas as mais suscetíveis, incluindo hospedeiros  
39 economicamente importantes, tais como tomate (*Solanum lycopersicum* L.), batata (*S.*  
40 *tuberosum* L.), berinjela (*S. melongena* L.), pimentão (*Capsicum annuum* L.) e fumo  
41 (*Nicotiana tabacum* L.) (38). No entanto, espécies de outras famílias também são hospedeiras  
42 deste patógeno, tais como, banana (*Musa* sp.), amora (*Morus alba* L.) e gengibre (*Zingiber*  
43 *officinale* Roscoe) (37).

44 Devido à grande diversidade, *R. solanacearum* é considerada um complexo de  
45 espécies, definido como um grupo de isolados intimamente relacionados, cujos membros  
46 individuais podem representar mais de uma espécie. Dois organismos relacionados,  
47 identificados através da análise de sequências da região 16S rRNA, participam desse  
48 complexo: blood disease bacterium (BDB) que ocorre na Indonésia e *R. syzygii* (Roberts et  
49 al.) Vaneechoutte et al., agente causal da doença de Sumatra do cravo da Índia, com  
50 ocorrências em Java e Sumatra (13).

51 Tradicionalmente, *R. solanacearum* tem sido subdividida em cinco raças com base em  
52 diferentes hospedeiros (22) e seis biovars com base na utilização de carboidratos (21).  
53 Ambas as classificações foram amplamente utilizadas por sua simplicidade e praticidade, mas  
54 não refletem a heterogeneidade dos isolados de *R. solanacearum* (27) e apresentam  
55 desvantagens tais como: tempo consumido para realização dos testes e obtenção dos  
56 resultados, não descrição em nível de subespécie, não predição das propriedades biológicas  
57 como agressividade e não correlação com a origem geográfica dos isolados bacterianos (17,  
58 36).

59 O emprego da técnica de RFLP (polimorfismos do comprimento de fragmentos de  
60 restrição), por Cook e Sequeira (8) e Cook et al. (9) possibilitou a separação de *R.*  
61 *solanacearum* em duas divisões: divisão 1, que compreende isolados principalmente da Ásia e  
62 divisão 2, que abrange isolados obtidos das Américas. Taghavi et al. (33) subdividiu a divisão  
63 2, em 2a (isolados das Américas) e 2b (isolados de *R. syzygii* e BDB), bem como uma divisão  
64 2c com isolados africanos foi proposta por Poussier et al. (29). Fegan e Prior (13) relataram a  
65 ocorrência de um grupo composto por isolados da Indonésia, utilizando análises da região ITS

66 (espacial intergênica) do rRNA 16S-23S e do gene da endoglucanase (*egl*). O sequenciamento  
67 da região ITS e do gene *egl* tem apoiado a existência das duas divisões e dos grupos  
68 originários da África e Indonésia (13).

69 Para melhor representar a diversidade desse complexo de espécies, Fegan e Prior (13)  
70 propuseram uma nova classificação hierárquica na qual *R. solanacearum* é dividida em quatro  
71 filotipos, os quais são relacionados com a região geográfica de origem (I: Ásia, II: Américas,  
72 III: África e IV: Indonésia), separados por PCR-multiplex com os primers 759-760 e NMult;  
73 52 sequevares, com base no sequenciamento dos genes *egl* e/ou de reparo do DNA (*mutS*); e  
74 clones, separados pelas técnicas rep-PCR e AFLP, entre outras.

75 Segundo Wicker (38), espécies do complexo *R. solanacearum* foram originadas na  
76 Oceania/Indonésia, e então migraram para a África e depois para a América do Sul e Ásia,  
77 provavelmente antes da fragmentação do continente ancestral, a Pangéia.

78 O sequenciamento dos genes de patogenicidade (*hrpB*), *egl* e *mutS* possibilitou separar  
79 cada filotipo em sequevares. O sequenciamento parcial do gene *egl* foi relatado como um bom  
80 indicador para demonstrar a filogenia do complexo de espécies *R. solanacearum* (12) e  
81 mostrou ser congruente com a filogenia baseada na hibridização do DNA em microarranjos  
82 (16).

83 Atualmente estudos de diversidade genética de isolados brasileiros abordando a nova  
84 classificação em filotipos e sequevares de *R. solanacearum* foram realizados apenas com  
85 isolados que causam doença em banana (1, 27) e batata (30). Entretanto, este tipo de  
86 abordagem é escassa para os isolados brasileiros com ampla gama de hospedeiros,  
87 tradicionalmente conhecidos como raça 1 (15).

88 Algumas medidas preventivas de controle da murcha bacteriana têm sido  
89 recomendadas, tais como: manejar a água do solo para evitar encharcamento; evitar  
90 ferimentos por implementos agrícolas; prevenir o ataque de nematóides e insetos; evitar  
91 movimentação a partir de focos da doença para outras áreas; eliminar plantas doentes,  
92 voluntárias infectadas e solanáceas invasoras; e fazer rotação de culturas por no mínimo um  
93 ano, com gramíneas (24). Entretanto, após a ocorrência de uma epidemia, as estratégias  
94 possíveis de desinfestação e modificações do solo, controle biológico e indução de resistência,  
95 apresentam baixa eficácia. O melhoramento para a resistência à murcha bacteriana é  
96 considerado uma medida eficiente de controle. No entanto, a quebra da resistência ocorre  
97 frequentemente devido a plasticidade genômica e fenotípica dentro do complexo de espécies  
98 *R. solanacearum* (35).

99 Por ser uma espécie com grande diversidade e que apresenta difícil controle, a  
100 caracterização dos isolados de *R. solanacearum* possibilitará a utilização de estratégias mais  
101 eficazes para o manejo da doença. Portanto, o objetivo do trabalho foi caracterizar a  
102 diversidade bioquímica, patogênica e filogenética de populações de *R. solanacearum* obtidas  
103 das regiões Norte e Nordeste do Brasil.

#### 104 **Material e Métodos**

105 **Descrição dos isolados e patogenicidade.** Do total de 99 isolados, 63 foram obtidos a  
106 partir de plantas sintomáticas das solanáceas tomate, jiló (*Solanum gilo* Raddi) e berinjela  
107 coletadas nas mesorregiões do Agreste e Mata do estado de Pernambuco (Tabela 1). Quatro  
108 isolados (isolado tipo de tomate e três isolados de batata) foram obtidos da Coleção de  
109 Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico, IBSBF, São Paulo, Brasil; 13 isolados (um  
110 de pepino (*Cucumis sativus* L.), um de jiló, dois de pimenta de cheiro (*Capsicum chinense*  
111 Jacq.), um de banana, um de maria-pretinha (*Solanum nigrum* L.), um de berinjela e 6 de  
112 tomate) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, INPA, Manaus, Brasil; 17 isolados  
113 (todos de pimentão) da Coleção de Culturas do Laboratório de Fitobacteriologia da  
114 Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Recife, Brasil; dois isolados (de banana)  
115 da EMBRAPA Tabuleiros Costeiros, Aracajú, Brasil. Como padrão de comparação foi  
116 utilizado o isolado tipo K60<sup>T</sup> que é o mesmo ATCC11696 (IBSBF 292), obtido de tomateiro e  
117 classificado como filotipo IIA, sequevar 7 (IIA-7).

118 Os 99 isolados de *R. solanacearum* foram inoculados em plântulas dos respectivos  
119 hospedeiros: tomate cv. TY2006, pimentão cv. Impacto, berinjela cv. Florida Market, jiló cv.  
120 Comprido Verde Claro, batata cv. Asterix, banana cv. Williams, pimenta de cheiro, pepino cv.  
121 Caipira e maria-pretinha. As sementes foram semeadas em bandeja de poliestireno contendo  
122 uma mistura de solo e húmus (3:1, v:v) e após 21 dias as plântulas foram transplantadas para  
123 vasos plásticos de 500 ml contendo o mesmo substrato. As plantas com 30 dias foram  
124 inoculadas pelo método do corte de raízes, fazendo-se com auxílio de um bisturi, corte  
125 semicircular no solo perto do caule da planta, no qual foram depositados 20 ml da suspensão  
126 bacteriana ( $5 \times 10^8$  UFC ml<sup>-1</sup>) (14). As testemunhas foram tratadas similarmente com água  
127 destilada. As plantas foram irrigadas diariamente e mantidas em casa de vegetação com  
128 temperatura média de  $36 \pm 2^\circ\text{C}$  e umidade relativa média de  $89 \pm 2\%$ . Para cada isolado,  
129 foram inoculadas 12 plantas que foram avaliadas durante 15 dias quanto à sintomatologia,  
130 usando o critério qualitativo: (-) planta sem sintoma e (+) planta murcha ou morta.

131 **Identificação dos isolados e determinação de filotipo.** Os isolados foram cultivados  
132 em meio NYDA (10 g dextrose, 3 g extrato de carne, 5 g extrato de levedura, 3 g peptona e 18

133 g ágar I<sup>-1</sup>) a 28°C durante 48 h. A extração do DNA foi realizada com o kit MiniPrep  
134 AxyPrep™ (Axygen Biosciences, EUA), seguindo as instruções do fabricante. A  
135 determinação dos filotipos foi realizada por meio da técnica filotipo multiplex (Pmx-PCR)  
136 utilizando-se os *primers* 759/760 (Invitrogen, Brasil) os quais amplificam um fragmento  
137 específico de 280 pb para *R. solanacearum* e, um conjunto de quatro *primers* específicos da  
138 série Nmult (Invitrogen), os quais amplificam fragmentos de 144, 372, 91 e 213 pb para os  
139 filotipos I, II, II e IV, respectivamente (13).

140 Dentre os 99 isolados, além do isolado tipo K60<sup>T</sup> utilizado como padrão, 47 isolados  
141 foram selecionados de acordo com a origem geográfica (regiões Norte e Nordeste),  
142 hospedeiro (tomate, pimentão, pimenta de cheiro, berinjela, jiló, pepino, banana e batata) e  
143 filotipo (I e II), para os experimentos de utilização de carboidratos e sensibilidade a  
144 substâncias inibitórias; patogenicidade em batata, pimentão e tomate; e determinação de  
145 sequevares através do sequenciamento dos genes *egl* e *mutS*. Para as análises filogenéticas, 53  
146 sequências de referência representando os quatro filotipos foram obtidas do Genbank para  
147 confirmação dos sequevares (Tabela 2).

148 **Perfil de utilização de carboidratos e sensibilidade a substâncias inibitórias.** Os 48  
149 isolados de *R. solanacearum* foram analisados pelo sistema Biolog GEN III (Biolog Inc.,  
150 USA) em microplacas com testes fenotípicos para utilização de 71 fontes de carbono e  
151 sensibilidade à 23 substâncias inibitórias, com testemunhas negativa e positiva, de acordo  
152 com as recomendações do fabricante. As fontes de carbono presentes na placa Biolog GEN III  
153 são: ácido acético, ácido acetoacético, ácido cítrico, ácido fórmico, ácido múcico, ácido  
154 propionóico, ácido quínico, bromo-ácido succínico, D-ácido aspártico, D-ácido galacturônico,  
155 D-ácido glucônico, D-ácido glucurônico, D-ácido málico, D-ácido sacárico, D-arabitol, D-  
156 celobiose, D-ester metílico de ácido láctico, D-frucose, D-frutose, D-frutose-6-PO<sub>4</sub>, D-  
157 galactose, D-Glicilo-L-Prolina, D-glicose-6-PO<sub>4</sub>, D-maltose, D-melobiose, D-manose,  
158 dextrina, D-rafinose, D-salicina, D-serina, D-sorbitol, D-trealose, D-turanose, estaquiase,  
159 gelatina, gentiobiose, glicerol, glucuronamida, inosina, lactona, L-arginina, L-ácido aspártico,  
160 L-ácido galactônico, L-ácido glutâmico, L-ácido láctico, L-ácido málico, L-ácido  
161 piroglutâmico, L-alanina, L-fucose, L-histidina, L-ramnose, L-serina, manitol, metil piruvato,  
162 mio-inositol, N-acetil-D-galactosamina, N-acetil-D-glucosamina, N-acetil-β-D-manosamina,  
163 N-acetil ácido neurâmico, pectina, p-hidroxi-ácido fenilacético, tween 40, γ-ácido amino  
164 butírico, α-ácido hidroxí butírico, α-D-glucose, α-D-lactose, α-keto-ácido butírico, α-keto-  
165 ácido glutárico, β-metil-D- glicosídeo, β-hidroxi-D,L-ácido butírico e 3-metil-glicose,  
166 sacarose. As substâncias inibitórias presentes na placa Biolog GEN III são: ácido fusídico,

167 ácido nalidíxico, aztreonam, brometo de sódio, butirato de sódio, guanidina HCL, lactato de  
168 sódio 1%, lincomicina, minociclina, NaCl 1%, NaCl 4%, NaCl 8%, niaproof 4, pH5, pH8,  
169 rifampicina SV, telurito de potássio, tetrazólio violeta, tetrazólio azul, troleandromicina e  
170 vancomicina.

171 Os isolados foram cultivados em meio sólido BUG<sup>®</sup> (Biolog Universal Growth) (Biolog  
172 Inc.) a 33°C ( $\pm 0,5^\circ\text{C}$ ) por 48 h, seguindo-se a preparação da suspensão em fluido de  
173 inoculação (IF-A) ajustando-se a transmitância para 92% em turbidímetro (Biolog Inc.). Em  
174 seguida, 100  $\mu\text{l}$  da suspensão foram dispensados em cada um dos 96 poços da microplaca. A  
175 incubação foi feita a 33°C por 22 h quando foi realizada a avaliação visual observando-se a  
176 mudança de coloração dos poços. Os isolados que cresceram lentamente foram avaliados após  
177 36 h. O experimento foi repetido com 20 isolados selecionados ao acaso para comprovação  
178 dos perfis gerados. Com os dados dos perfis para 94 características bioquímicas foi gerado um  
179 dendrograma, baseado no método UPGMA, mostrando as relações metabólicas entre os 48  
180 isolados de *R. solanacearum*.

181 **Patogenicidade a batata, pimentão e tomate.** Os 48 isolados selecionados, incluindo o  
182 isolado tipo, foram cultivados como descrito anteriormente e inoculados em plantas de batata  
183 (cv. Asterix), pimentão (cv. Impacto) e tomate (cv. TY2006). O preparo das plantas e  
184 inoculação foi realizado conforme descrito para os testes de patogenicidade (14). As plantas  
185 foram irrigadas por sub-irrigação conforme necessário e mantidas em casa de vegetação onde  
186 a temperatura variou entre 28 e  $32,4 \pm 5^\circ\text{C}$  e a umidade relativa entre 61 e  $74 \pm 5\%$ . A  
187 avaliação foi realizada durante 15 dias observando-se diariamente a incidência de murcha.  
188 Cada isolado foi inoculado em 10 plantas de cada hospedeiro. Quando pelo menos duas entre  
189 as 10 plantas inoculadas apresentaram sintomas, a interação foi considerada positiva (+).

190 **Análises filogenéticas.** As sequências parciais dos genes *egl* (750 pb) e *mutS* (758 pb)  
191 foram amplificadas com os *primers* Endo-F (5'-ATGCATGCCGCTGGTCGCCGC-3')/Endo-  
192 R (5'-GCGTTGCCCGGCACGAACACC-3') e *mutS*-RsF 1570 (5'- ACAG  
193 CGCCTTGAGCCGGTACA-3')/*mutS*-RsR 1926 (5'- GCTGATCACCGGCCCGAA CAT-  
194 3'), respectivamente (38). A mistura de reação (50  $\mu\text{l}$  volume total) foi composta por: tampão  
195 10X (500 mM KCl, 100 mM Tris HCl) (1X);  $\text{MgCl}_2$  (1,5mM); dNTPs (200  $\mu\text{M}$ ); *primer* (2  
196  $\mu\text{M}$ ); Taq DNA Polimerase (Fermentas Life Sciences, Canadá) (2 U) e DNA (100 ng). As  
197 reações foram amplificadas em termociclador modelo PTC – 100 (MJ Research, Estados  
198 Unidos) e submetidas às seguintes condições: *egl* – 96°C por 9 min, seguindo-se 30 ciclos de  
199 1 min a 95°C, 1 min a 70°C e 2 min a 72°C e; *mutS* – 96°C por 5 min, seguindo-se 35 ciclos de  
200 1 min a 94°C, 1 min a 66°C e 1 min a 72°C. A etapa de extensão final foi conduzida com um

201 ciclo de 10 min a 72°C para os dois genes. Os produtos de PCR foram submetidos à  
202 eletroforese em gel de agarose a 1,5% preparado em TBE 0,5X (5,4 g de Tris-base; 2,75 g de  
203 ácido bórico e 0,375 g de EDTA, para 1000 ml) durante 1,5 h, junto com o marcador Gene  
204 Ruler 100 pb DNA Lader (Fermentas Life Sciences). A purificação dos produtos da PCR foi  
205 feita com o kit de purificação PCR Clean Up (Axygen Biosciences) e os sequenciamentos das  
206 fitas duplas foram realizados pela Macrogen® (Coréia do Sul).

207 A análise dos cromatogramas gerados pelo sequenciamento dos genes *egl* e *mutS* dos  
208 48 isolados de *R. solanacearum* e a montagem dos contigs foram realizadas utilizando o  
209 software Staden Package® versão 2.0 (31). As sequências de cada gene foram alinhadas  
210 através da ferramenta ClustalW contida no software MEGA 5.0® (34) e manualmente  
211 ajustadas para obter máxima similaridade entre as sequências. A incongruência entre as  
212 sequências dos genes concatenados nas duas abordagens foi avaliada com auxílio do  
213 programa PAUP\* v. 4.0b10 (32) por meio do teste de homogeneidade de partição, realizado  
214 com base na análise das diferenças do comprimento das incongruências (ILD) com 100  
215 *bootstraps*. As relações filogenéticas entre as sequências foram analisadas pelos métodos de  
216 Neighbor-Joining (NJ), Máxima Parcimônia (MP) e Máxima Verossimilhança (ML). A  
217 análise de NJ foi realizada com o algoritmo de Jukes e Cantor. As análises de máxima  
218 parcimônia foram realizadas pelo método de buscas heurísticas TBR. Análises de *bootstrap*  
219 com 1000 repetições foram realizadas para estimar a confiabilidade dos ramos das árvores  
220 geradas pelos três métodos. As análises de MJ e MP foram realizadas com auxílio do  
221 programa MEGA 5.0® (34). Para análise de ML, o modelo de substituição de nucleotídeos foi  
222 selecionado por meio do critério de informações bayesiano (bayesian information criterion –  
223 BIC) com auxílio do programa JModelTest 2.1 (28) e a árvore construída, utilizando-se o  
224 software PhyML (18).

## 225 **Resultados**

226 **Patogenicidade, Identificação dos isolados e determinação de filotipo.** Todos os  
227 isolados induziram sintomas da doença em seus respectivos hospedeiros a partir de três dias  
228 após a inoculação.

229 A análise de filotipo Multiplex (Pmx) confirmou a espécie *R. solanacearum* para todos  
230 os isolados e revelou, nas regiões Norte e Nordeste, a presença de dois dos quatro filotipos já  
231 descritos no Brasil: o filotipo I da Ásia e o filotipo II das Américas (15). Os isolados  
232 pertencentes ao filotipo I formaram um grande grupo, abrigando 71,7% dos 99 isolados  
233 enquanto os isolados do filotipo II representaram 28,3% dos isolados coletados nestas regiões  
234 (Tabela 1). Na região Norte só foi encontrado o filotipo II enquanto na região Nordeste foram

235 encontrados os dois filotipos, sendo 92,5% dos isolados pertencente ao filotipo I e 7,5 % ao  
236 filotipo II.

237 **Perfil de utilização de carboidratos e sensibilidade a substâncias inibitórias.**

238 Nenhuma fonte de carbono foi utilizada por 100% dos isolados. Os carboidratos mais  
239 utilizados foram: L- ácido aspártico (75%), ácido D-galacturônico (91,6%), ácido D-  
240 glucurônico (91,6%), ácido L-glutâmico (81,2%), ácido L-málico (77%), ácido quínico  
241 (77%), D-frutose (75%),  $\alpha$ -D-glicose (77%), pectina (89,5%). Similarmente, nenhuma  
242 substância inibiu todos os isolados. Foi demonstrada resistência à lincomicina (77%),  
243 rifampicina SV (83,3%), tetrazólio violeta (89,5%), tetrazólio azul (85,4%) e vancomicina  
244 (93,7%). Os 26 isolados pertencentes ao filotipo I foram avaliados com 22 h de incubação  
245 enquanto os 22 isolados do filotipo II foram avaliados com 36 h. Quando o experimento foi  
246 repetido com 20 isolados, estes apresentaram o mesmo perfil metabólico obtido no primeiro  
247 experimento.

248 O dendrograma gerado a partir do perfil bioquímico separou os 48 isolados de *R.*  
249 *solanacearum* a 75% de similaridade em 28 grupos. Vinte isolados formaram grupos unitários  
250 e os demais formaram grupos altamente relacionados aos filotipos I e II (Fig.1).

251 **Patogenicidade a batata, pimentão e tomate.** Dentre os 26 isolados do filotipo I,  
252 84,6% foram patogênicos a batata, 65,3% patogênicos ao pimentão e 100% patogênicos ao  
253 tomate (Tabela 3). Dentre os 22 isolados do filotipo II, 72,7% foram patogênicos a batata,  
254 18,1% patogênicos ao pimentão e 100% patogênicos ao tomate.

255 **Análises filogenéticas.** As sequências parciais dos genes *egl* e *mutS* dos 48 isolados  
256 representativos da coleção foram comparadas com 53 sequências de referência do gene *egl* e  
257 41 sequências de referência do gene *mutS* representando todos os filotipos (Tabela 2).

258 As análises revelaram alta diversidade genética entre os 48 isolados brasileiros  
259 selecionados. As árvores construídas com as sequências parciais dos genes *egl* (Fig. 2) e *mutS*  
260 (dados não apresentados) por meio dos métodos de Neighbor-Joining e Máxima  
261 Verossimilhança não foram totalmente congruentes. No entanto, a árvore do gene *egl* foi  
262 altamente congruente com a árvore construída com a sequência concatenada dos genes *egl* e  
263 *mutS* pelo método de Máxima Verossimilhança, com o modelo geral de tempo-reverso  
264 (general time reversible – GTR) e com variação gamma (G) (Fig. 3). As sequevars I-17, I-  
265 18, IIA-53, IIA-39 e IIB-1, foram observadas nas duas árvores. Os isolados de batata  
266 IBSBF40 e IBSBF143 foram agrupados com o isolado J516 oriundo de batata em Reunião,  
267 pertencente à sequevar IIB-1. Dois isolados de banana, IBSBF2570 e SFC, foram agrupados  
268 com a sequevar IIA-53, a qual ainda está sendo proposta para isolados do Moko (1)

269 provenientes do estado de Sergipe. Um único isolado, V23, oriundo de tomate, agrupou com a  
270 sequevar IIA-39. Os isolados pertencentes ao filotipo I, encontrados na região Nordeste,  
271 foram agrupados nas sequevares I-17 (três isolados: dois de jiló e um de berinjela) e na  
272 sequevar I-18 (24 isolados: oito de berinjela, cinco de jiló, três de pimentão e oito de tomate).  
273 No entanto, dois isolados (V44 de pepino e CRMRS 107 de tomate) e três grupos não se  
274 agruparam com nenhuma das sequevares até então descritas (Fig. 2 e Fig. 3). O primeiro  
275 grupo foi formado pelos isolados CRMRS 92, CRMRS 94, CRMRS 101 e CRMRS 106,  
276 todos de tomate da região Nordeste. O segundo grupo foi formado pelos isolados B97,  
277 CRMRS44, CRMRS85, FIO18C2, V6, V28 e V17 oriundos de diferentes hospedeiros e das  
278 regiões Brasileiras, estando mais proximamente relacionados com a sequevar IIA-41. O  
279 terceiro grupo foi formado pelos isolados V35 e V42, oriundos de pimenta de cheiro e jiló da  
280 região Norte, pertencentes ao filotipo II-A.

### 281 **Discussão**

282 A murcha bacteriana causada por *R. solanacearum* é considerada um fator limitante  
283 para o cultivo de diversas espécies de plantas economicamente importantes nas regiões Norte  
284 (7) e Nordeste (15, 27) do Brasil. Neste estudo, os 99 isolados de nove diferentes hospedeiros  
285 foram identificados utilizando Pmx-PCR, sendo 71,7% do filotipo I e 28,3% do filotipo II,  
286 indicando uma maior ocorrência do filotipo I na região Nordeste. Estes resultados concordam  
287 com aqueles obtidos por Garcia et al. (15) que relataram o filotipo I com alta predominância  
288 (97,4%) na região Nordeste, em pimentão. Na região Norte, só foi encontrado o filotipo II.  
289 Segundo Coelho Neto (7), em levantamento realizado na região Norte, a biovar 1 (atual  
290 filotipo II) apresentou 67,8% dos total de 267 isolados, enquanto a biovar 3 (filotipo I)  
291 apresentou 32,2% deste total. Apesar deste estudo não determinar diretamente o filotipo do  
292 isolado, a relação entre filotipo e biovar foi relatada por Ailloud et al. (2). Portanto, é provável  
293 que o filotipo I também esteja presente na região Norte.

294 Os 48 isolados de *R. solanacearum* apresentaram alta diversidade bioquímica na  
295 utilização das 71 fontes de carbono e sensibilidade às 23 substâncias inibitórias, pois não foi  
296 encontrada nenhuma fonte de carbono de uso comum a todos e nenhuma substância foi capaz  
297 de inibir todos os isolados. A obtenção de resultados idênticos na repetição do experimento  
298 com 20 isolados comprovou a reprodutibilidade desta técnica. A maior velocidade com que  
299 os isolados do filotipo I utilizaram as fontes de carbono e foram resistentes às substâncias  
300 inibitórias das microplacas Biolog GenIII indica que este filotipo apresenta uma maior  
301 capacidade de se adaptar a novos ambientes. Isolados do filotipo I sobreviveram até seis  
302 meses a 4°C em tubérculos de batata armazenados (25), o que foi explicado devido à



303 habilidade de utilizar uma ampla variedade de compostos orgânicos como fonte de energia  
304 (19).

305 A maior prevalência do filotipo I comparado ao filotipo II, conforme observado na  
306 região Nordeste do Brasil, seria justificada porque os isolados do filotipo I poderiam competir  
307 mais efetivamente com isolados de outros filotipos em determinado habitat. Segundo Wicker  
308 (38), o filotipo I se disseminou por longas distâncias rapidamente, provavelmente por meio de  
309 infecções latentes em material vegetal. Este filotipo foi relatado na Ásia, África, América  
310 Central e do Sul e Oceania (4, 11), o que sugere uma grande aptidão para se estabelecer,  
311 principalmente em condições tropicais. Atualmente, o filotipo I, antigamente conhecido como  
312 biovars 3, 4 e 5 (2) é a linhagem evolutiva que afeta o maior número de hospedeiros (39),  
313 incluindo solanáceas, bananeira, helicônia, antúrio, amoreira, amendoim e gengibre (37).  
314 Além disso, esses isolados apresentam alta capacidade de recombinação (6), ampla habilidade  
315 de disseminação e grande plasticidade de virulência (39).

316 Dentre os hospedeiros, batata, pimentão e tomate (Tabela 3), o pimentão foi o mais  
317 resistente e o tomate o mais suscetível aos isolados dos filotipos I e II. No entanto, cortes  
318 transversais no caule de plantas de pimentão assintomáticas realizados aos 15 dias  
319 evidenciaram a presença de escurecimento dos vasos do xilema. Segundo Lebau et al. (23)  
320 genótipos podem desenvolver pouco ou nenhum sintoma, mas apresentar o caule parcialmente  
321 ou altamente colonizado por *R. solanacearum*. Em geral, a maioria dos isolados foi  
322 patogênica a pelo menos dois hospedeiros, indicando baixa diversidade e evidenciando que  
323 pertencem ao grupo de isolados de ampla gama de hospedeiros (5). Os isolados provenientes  
324 de jiló foram patogênicos aos três hospedeiros, o que pode indicar que esses isolados são  
325 emergentes e para infectarem o jiló, considerado como solanácea rústica, passaram por um  
326 período de adaptação e tornaram-se mais agressivos.

327 A árvore baseada no gene *egl* (Fig. 2) e a árvore concatenada dos genes *egl* e *mutS*  
328 (Fig. 3) foram totalmente congruentes com os resultados obtidos na análise de Pmx-PCR e  
329 posicionaram 26 isolados no filotipo I e 22 isolados no filotipo II, com base na classificação  
330 hierárquica de Fegan e Prior (13). Cada filotipo é subdividido em sequevars baseados nas  
331 diferentes sequências da região dos genes *egl* e *mutS*. A classificação em filotipos é altamente  
332 consistente, sendo capaz de revelar informações sobre a origem geográfica e, em alguns  
333 casos, em relação à patogenicidade dos isolados. Além disso, a filogenia baseada na sequência  
334 parcial do gene *egl* para o complexo de espécies de *R. solanacearum* é relatada e confirmada  
335 como um bom indicador do relacionamento entre isolados (1, 12), sendo congruente com  
336 resultados obtidos a partir de estudos de hibridização em microarranjos (16).

337 As árvores filogenéticas (Fig. 2 e 3) mostraram baixa diversidade entre os isolados do  
338 filotipo I, os quais foram agrupados nas sequevares 18 (88,8%) e 17 (11,5%). A baixa  
339 diversidade genética do filotipo I foi atribuída por Wicker et al. (39) ao fato de ser este  
340 filotipo uma linhagem recombinogênica relativamente recente. No presente trabalho, a baixa  
341 diversidade genética pode ser atribuída a um evento de introdução único e recente na região  
342 Nordeste. A introdução do filotipo I no Brasil, o qual foi designado inicialmente como  
343 Divisão I (9) e contem isolados pertencentes à Ásia, pode ter ocorrido devido à imigração  
344 asiática e ao estabelecimento de colônias japonesas no Brasil, inclusive em Pernambuco (15).  
345 Por outro lado, visto que a transmissão de *R. solanacearum* por sementes pode ocorrer em  
346 tomate e berinjela (26), a introdução deste filotipo também pode ter ocorrido por meio da  
347 importação de novas cultivares. No presente estudo, o filotipo I foi encontrado nas  
348 mesorregiões da Mata e Agreste do estado de Pernambuco, como relatado por Garcia et al.  
349 (15), onde predomina o clima tropical chuvoso, com verão seco. Estes resultados concordam  
350 com aqueles obtidos por Toukam et al. (35), os quais detectaram a presença do filotipo I em  
351 regiões quentes e úmidas em Camarões (África).

352 O Brasil é o provável centro de origem do filotipo II (38) que possui alta diversidade  
353 genética e se diferencia nos subgrupos IIA e IIB. Ambos os subgrupos migraram para o  
354 mundo inteiro, provavelmente através de bananeiras infectadas, plantas ornamentais e  
355 tubérculos de batata (3, 25). Estas duas divisões apresentam padrões evolutivos diferentes  
356 com o filotipo IIA possuindo alta capacidade de recombinação, diversificado e em expansão e  
357 o filotipo IIB sendo quase clonal e com gama restrita de hospedeiros (13). A diversidade de  
358 sequevares encontrados no filotipo II, além da presença de seis grupos não determinados  
359 concorda com os resultados de Albuquerque (1) que relatou a presença dos sequevares IIA-6,  
360 IIA-24, IIA-25, IIA-41 e IIA-53 (novo sequevar) no filotipo II em isolados do Moko da  
361 bananeira. Esta variabilidade aponta o Brasil não apenas como centro de origem, mas  
362 também, como centro de diversidade do filotipo II.

363 Os isolados pertencentes ao filotipo II se diferenciaram em IIA e IIB. No filotipo IIA,  
364 os isolados SFC e IB2570, provenientes do estado de Sergipe, agruparam com a sequevar IIA-  
365 53, a qual está sendo proposta por Albuquerque (1) para isolados de bananeira oriundos  
366 daquele estado. Isto reforça a hipótese que os isolados desta sequevar estejam relacionados ao  
367 Moko e que esta doença é de fato endêmica do estado de Sergipe, mais precisamente na  
368 região do baixo São Francisco, conforme sugerido anteriormente (1).

369 Os quatro agrupamentos do filotipo IIA que não representaram nenhuma das  
370 sequevares até então descritas na literatura, são sugeridos como quatro novas sequevares: IIA-

371 54 (CRMRS 92, CRMRS 94, CRMRS 101e CRMRS 106), IIA-55 (B97, CRMRS44,  
 372 CRMRS85, FIO18C2, V6, V28 e V17) e IIA-56 (V35 e V42), e ampliam dessa forma a  
 373 diversidade já conhecida (1, 39) dentro do complexo *R. solanacearum*. O isolado B97 (nova  
 374 sequevar IIA-55) proveniente de banana da região Norte não se agrupou com nenhuma das  
 375 sequevares já relatadas para o Moko da bananeira e, portanto, essa nova sequevar deverá ser  
 376 incluída dentro das sequevares relacionadas ao Moko (IIB-3, IIB-4, IIA-6, IIA-24, IIA-25,  
 377 IIA-41 e IIA-53) (1, 2).

378 O conhecimento da diversidade de populações de *R. solanacearum* é fundamental para  
 379 a adequação de medidas de controle ou para o desenvolvimento de novas estratégias baseadas  
 380 na resistência de germoplasma (1). Foi demonstrada uma alta diversidade bioquímica e baixa  
 381 diversidade patogênica dos isolados de *R. solanacearum* dos filotipos I e II. Foi também  
 382 evidenciada uma baixa diversidade genética do filotipo I no Nordeste e alta diversidade do  
 383 filotipo II no Norte e Nordeste. Esta alta diversidade genética indicou a existência de quatro  
 384 novas sequevares dentro do complexo *R. solanacearum*.

385 **Agradecimentos.** Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e  
 386 Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo a Jéssica R. da Silva, de pesquisa a  
 387 Dr. Adriano M. F. Silva (Proc. 101000/2011-1), Dra. Rosa L. R. Mariano (Proc.  
 388 309697/2011-5) e Dra. Elineide B. Souza. A Dra. Rosalee Coelho do INPA/AM pela doação  
 389 de isolados para este estudo.

#### 390 **Literatura Citada**

- 391 1. Albuquerque, G. M. R. 2013. Diversidade de isolados brasileiros de *Ralstonia*  
 392 *solanacearum* raça 2. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal  
 393 Rural de Pernambuco, Recife.
- 394 2. Ailloud, F., Cellier, G., Yahiaoui, N., Remenant, B., Allen, C., e Prior, P. 2012. Banana  
 395 moko disease and diversity of its unpredictable causative agent *Ralstonia solanacearum*.  
 396 In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 45. 2012, Manaus. **Anais...**  
 397 Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2012. CD-ROM 2.
- 398 3. Buddenhagen, I., e Kelman, A. 1964. Biological and physiological aspects of bacterial  
 399 wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annu. Rev. Phytopathol. 2: 203-230.
- 400 4. Buddenhagen, I. W. 1986. Bacterial wilt revisited. Pages: 126-143 in: Persley GJ (ed.)  
 401 Bacterial wilt disease in Asia and the pacific. ACIAR: Canberra, Australia.
- 402 5. Celier, G., e Prior, P. 2010. Deciphering phenotypic diversity of *Ralstonia solanacearum*  
 403 strains pathogenic to potato. Phytopathology 100:1250-1261.

- 404 6. Coupat, B., Chaumeille-Dole, F., Fall, S., Prior, P., Simonet, P., e Nesme, X. 2008.  
405 Natural transformation in the *Ralstonia solanacearum* species complex: number and size  
406 of DNA that can be transferred. *FEMS Microbiol Ecol* 66:14-24.
- 407 7. Coelho Neto, R. A., Pereira, B. G., Noda, H., e Boher, B. 2004 Caracterização de isolados  
408 de *Ralstonia solanacearum* obtidos de tomateiros em várzea e em terra firme, no Estado  
409 do Amazonas, *Fitopatol. Bras.*, 28:362-367.
- 410 8. Cook, D., Barlow, E., Sequeira, L. 1989. Genetic diversity of *Pseudomonas*  
411 *solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphisms with DNA probes  
412 that specify virulence and the hypersensitive response. *Mol. Plant-Microbe In.* 2:113-121
- 413 9. Cook, D., Barlow, E., e Sequeira, L. 1991. DNA probes as tools for the study of  
414 hostpathogen evolution: the example of *Pseudomonas solanacearum*. Pages: 103-108 in:  
415 *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*. H, Henneke e D. P. S.  
416 Verma, eds. Kluwer Academic Publishers: Netherlands.
- 417 10. Cook, D., e Sequeira, L. 1994. Strain differentiation of *Pseudomonas solanacearum* by  
418 molecular genetic methods. In: *Bacterial Wilt: The Disease and Its Causative Agent,*  
419 *Pseudomonas solanacearum*. A. C. Hayward e G. L Hartman, eds. CAB International,  
420 Wallingford, UK.
- 421 11. Elphinstone, J. G. 2005. The current bacterial wilt situation: a global overview. Pages: 9-  
422 28 in: *Bacterial Wilt Disease and The Ralstonia solanacearum Species Complex*. C.  
423 Allen, P. Prior e A. C. Hayward, eds. APS Press: St. Paul, MN.
- 424 12. Fegan, M., e Prior, P. 2006. Diverse members of the *Ralstonia solanacearum* species  
425 complex cause bacterial wilt of banana. *Australas. Plant Pathol.*, 35:93-101.
- 426 13. Fegan, M., e Prior, P. 2005. How complex is the *Ralstonia solanacearum* species  
427 complex? Pages: 449-461 in: *Bacterial Wilt disease and the Ralstonia solanacearum*  
428 *species complex*. Society, 2005. In: C. Allen, P. Prior e A. C. Hayward, eds. American  
429 *Phytopathological*, St. Paul, MN.
- 430 14. Felix K. C. S, Souza E. B., Michereff, S. J., e Mariano R.L.R. 2012. Survival of *Ralstonia*  
431 *solanacearum* in infected tissues of *Capsicum annuum* and in soils of the state of  
432 Pernambuco, Brazil. *Phytoparasitica*, 40:53-62.
- 433 15. Garcia, A. L., Lima, W. G., Souza, E. B., Michereff, S. J., e Mariano, R. L. R. 2013.  
434 Characterization of *Ralstonia solanacearum* causing bacterial wilt bell pepper in the state  
435 Pernambuco, Brasil. *J. of Plant Pathol.* 95:237-245.

- 436 16. Guidot, A., Prior, P., Shoenfeld, J., Carrere, S., Genin, S., Boucher, C. 2007. Genomic  
437 structure and phylogeny of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from gene  
438 distribution analysis. J. Bacteriol. 189:377-387.
- 439 17. Gillings, M. e Fahy, P. 1993. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum* biovars 2  
440 and N2 assessed using restriction endonuclease analysis of total genomic DNA. Plant  
441 Pathology 42:744-753
- 442 18. Guindon, S. e Gascuel, O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large  
443 phylogenies by maximum likelihood. Syst. Biol. 52:696-704.
- 444 19. Grey, B. E., e Steck, T. R. 2001. The viable but nonculturable state  
445 of *Ralstonia solanacearum* may be involved in long-term survival and plant  
446 infection. Appl. Environ Microbiol. 67:3866-3872.
- 447 20. Grover, A., Azmi, W., Gadewar, A. V., Pattanayak, D., Naik, P. S., Shekhawat, G. S., e  
448 Chakrabarti, S. K. 2006. Genotypic diversity in a localized population of  
449 *Ralstoniasolanacearum* as revealed by random amplified polymorphic DNA markers. J.  
450 of App. Microbiol. 101:798-806.
- 451 21. Hayward, A. C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. J. App. Bacteriol.  
452 27:265-277.
- 453 22. He, L. Y., Sequeira, L., e Kelman, A. 1983. Characteristics of strains of *Pseudomonas*  
454 *solanacearum*. Plant Dis. 67:1357-1361.
- 455 23. Lebeau, A., Daunay, M. C., Frary, A., Palloix, A., Wang, J. F., Dintinger, J., Chiroleu, F.,  
456 Wicker, E. e Prior, P. Bacterial wilt resistance in tomato, pepper, and eggplant: genetic  
457 resources respond to diversity strains in the *Ralstonia solanacearum* complex species.  
458 Phytopathology 101:154-165.
- 459 24. Lopes, C. A., e Quezado-Soares, A. M. 2001. Doenças bacterianas das hortaliças -  
460 diagnose e controle. Brasília: Embrapa – CNPH. 72p.
- 461 25. Milling, A., Meng, F. H., Denny, T. P., e Allen, C. 2009. Interactions with hosts at cool  
462 temperatures, not cold tolerance, explain the unique epidemiology of *Ralstonia*  
463 *solanacearum* race 3 biovar 2. Phytopathology 99:1127-1134.
- 464 26. Momol, T., Pradhanang, P., e Lopes, C. A. 2008. Bacterial wilt of pepper. Retrieved dec  
465 10, 2010, from EDIS, University of Florida IFAS Extension. <http://edis.ifas.ufl.edu>.
- 466 27. Pinheiro, C. R., Amorim, J. A. E., Diniz, L. E. C., Silva, A. M. F., TALAMINI, V., e  
467 SOUZA JÚNIOR, M. T. 2011. Diversidade genética de isolados de *Ralstonia*  
468 *solanacearum* e caracterização molecular quanto a filotipos e sequevares. Pesq. Agropec.  
469 Bras. 46:593-602.

- 470 28. Posada, D. 2008. JModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol. Ecol. Notes* 6:288-  
471 295.
- 472 29. Poussier, S., Trigalet-Demery D., Vanderwalle , P., Goffinet, B., Luisetti, J. e Trigalet, A.  
473 2000. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* as assessed by PCR R-RFLP of the  
474 *hrp* gene region, AFLP and 16S rRNA sequence analysis, and identification of an African  
475 subdivision. *Microbiology* 146:1679-1692.
- 476 30. Santana, B. G., Lopes, C. A., Alvarez, E., Barreto, C. C., Allen, C. e Quirino, B. F. 2012.  
477 Diversity of Brazilian biovar 2 strains of *Ralstonia solanacearum*. *J. Gen. Plant Pathol.*  
478 78:190-200.
- 479 31. Staden, R., Beal, K. F. e Bonfield, J. K. 1998. The Staden package. Pages: 115-130 in:  
480 Bioinformatics methods and protocols. S. Misener e S. A. Krawetz, eds. Humana, New  
481 York.
- 482 32. Sowfford, D.L. 2002. Paup\*. Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other  
483 methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- 484 33. Taghavi, M., Hayward, C., Sly, L. I. e Fegan, M. 1996. Analysis of the phylogenetic  
485 relationships of strains of *Burkholderia solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, and the  
486 Blood Disease Bacterium of banana based on 16S rRNA gene sequences. *Int. J Syst*  
487 *Bacteriol.* 46:10-15.
- 488 34. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., e Nei, M. 2011. MEGA5: molecular  
489 evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and  
490 maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28:2731-2739.
- 491 35. Toukam, G. M. S., Cellier, G., Wicker, E., Guilaub, C., Kahane, R., Allen, C., e Prior, P.  
492 2009. Broad Diversity of *Ralstonia solanacearum* strains in Cameroon. *Plant Dis.*  
493 93:1123-1130
- 494 36. Villa, J. E., Tsuchiya, K., Horita, M., Natural, M., Opina, N., e Hyakumachi, M. 2005.  
495 Phylogenetic relationships of *Ralstonia solanacearum* species complex strains from Asia  
496 and other continents baseado on 16S rDNA, endoglucanase, and *hrpB* gene sequences. *J.*  
497 *Gen.Plant Pathol.* 31:39-46.
- 498 37. Xu, J. O., Pan, Z. C, Xu, J. S, Zhang, Z., Zhang, H., Zhang, L. Q., He, L. Y., e Feng., J.  
499 2009. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains from China. *Eur. J. Plant*  
500 *Pathol.* 125:641–653.
- 501 38. Wicker, E., Grassart, L., Coranson-Beaudu, R., Mian, D., Guilbaud, C., Fegan, M., e  
502 Prior, P. 2007. *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies)  
503 exhibiting a new pathogenic potential. *Appl. and Environ. Microbiol.* 73:6790-6801.

- 504 39. Wicker, E., Lefeuvre, P., Cambiaire, J. C., Lemaire, C., Poussier, S., e Prior, P. 2011.  
505 Contrasting recombination patterns and demographic histories of the plant  
506 pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from MLSA. ISME J. 6:961-974.

507 Tabela 1. Isolados brasileiros de *Ralstonia solanacearum* utilizados neste estudo

ISOLADO	HOSPEDEIRO	ORIGEM	FILOTIPO/ SEQUEVAR	GenBank	
				<i>egl</i>	<i>mutS</i>
CRMRS55	Berinjela	Chã Grande/PE	I	ND <sup>y</sup>	ND
CRMRS57	Berinjela	Chã Grande/PE	I	ND	ND
CRMRS58	Berinjela	Chã Grande/PE	I	ND	ND
CRMRS62	Berinjela	Chã Grande/PE	I	ND	ND
CRMRS64	Berinjela	Chã Grande/PE	I	ND	ND
CRMRS65	Berinjela	Chã Grande/PE	I	ND	ND
CRMRS66	Berinjela	Chã Grande/PE	I	ND	ND
CRMRS67	Berinjela	Chã Grande/PE	I	ND	ND
CRMRS68	Berinjela	Chã Grande/PE	I	ND	ND
CRMRS71	Berinjela	Chã Grande/PE	I	ND	ND
CRMRS72	Berinjela	Chã Grande/PE	I	ND	ND
CRMRS73	Berinjela	Chã Grande/PE	I	ND	ND
CRMRS84	Berinjela	Recife/PE	I	ND	ND
CRMRS113	Berinjela	Gravatá/PE	I	ND	ND
CRMRS75	Jiló	Chã Grande/PE	I	ND	ND
CRMRS81	Jiló	Chã Grande/PE	I	ND	ND
CRMRS82	Jiló	Chã Grande/PE	I	ND	ND
CRMRS28	Pimentão	Chã Grande/PE	I	ND	ND
CRMRS29	Pimentão	Bezerros/PE	I	ND	ND
CRMRS30	Pimentão	Bezerros /PE	I	ND	ND
CRMRS31	Pimentão	Chã Grande/PE	I	ND	ND
CRMRS32	Pimentão	Chã Grande/PE	I	ND	ND
CRMRS33	Pimentão	Chã Grande/PE	I	ND	ND
CRMRS35	Pimentão	Garanhuns/PE	I	ND	ND
CRMRS36	Pimentão	Chã Grande/PE	I	ND	ND
CRMRS37	Pimentão	Chã Grande/PE	I	ND	ND
CRMRS38	Pimentão	Chã Grande/PE	I	ND	ND
CRMRS40	Pimentão	Chã Grande/PE	I	ND	ND
CRMRS41	Pimentão	Caruaru/PE	I	ND	ND
CRMRS43	Pimentão	Caruaru/PE	I	ND	ND
CRMRS46	Pimentão	Sairé/PE	I	ND	ND
CRMRS47	Pimentão	Sairé/PE	I	ND	ND
CRMRS89	Tomateiro	Camocim de S. Félix/PE	I	ND	ND
CRMRS91	Tomateiro	Camocim de S. Félix/PE	I	ND	ND
CRMRS93	Tomateiro	Camocim de S. Félix/PE	I	ND	ND
CRMRS98	Tomateiro	Camocim de S. Félix/PE	I	ND	ND
CRMRS99	Tomateiro	Camocim de S. Félix/PE	I	ND	ND
CRMRS102	Tomateiro	Camocim de S. Félix/PE	I	ND	ND
CRMRS104	Tomateiro	Camocim de S. Félix/PE	I	ND	ND
CRMRS105	Tomateiro	Camocim de S. Félix/PE	I	ND	ND
CRMRS108	Tomateiro	Camocim de S. Félix/PE	I	ND	ND
CRMRS114	Tomateiro	Gravatá/PE	I	ND	ND
CRMRS115	Tomateiro	Gravatá/PE	I	ND	ND
CRMRS116	Tomateiro	Gravatá/PE	I	ND	ND
CRMRS118	Tomateiro	Gravatá/PE	I	ND	ND
CRMRS119	Tomateiro	Gravatá/PE	I	ND	ND
CRMRS83*	Berinjela	Recife/PE	I/17	Este estudo	Este estudo
CRMRS76*	Jiló	Chã Grande/PE	I/17	Este estudo	Este estudo
CRMRS78*	Jiló	Chã Grande/PE	I/17	Este estudo	Este estudo
CRMRS53*	Berinjela	Chã Grande/PE	I/18	Este estudo	Este estudo
CRMRS54*	Berinjela	Chã Grande/PE	I/18	Este estudo	Este estudo
CRMRS56*	Berinjela	Chã Grande/PE	I/18	Este estudo	Este estudo
CRMRS60*	Berinjela	Chã Grande/PE	I/18	Este estudo	Este estudo
CRMRS61*	Berinjela	Chã Grande/PE	I/18	Este estudo	Este estudo
CRMRS63*	Berinjela	Chã Grande/PE	I/18	Este estudo	Este estudo
CRMRS69*	Berinjela	Chã Grande/PE	I/18	Este estudo	Este estudo
CRMRS70*	Berinjela	Chã Grande/PE	I/18	Este estudo	Este estudo
CRMRS74*	Jiló	Chã Grande/PE	I/18	Este estudo	Este estudo



CRMRS77*	Jiló	Chã Grande/PE	I/18	Este estudo	Este estudo
CRMRS79*	Jiló	Chã Grande/PE	I/18	Este estudo	Este estudo
CRMRS80*	Jiló	Chã Grande/PE	I/18	Este estudo	Este estudo
CRMRS34*	Pimentão	Chã Grande/PE	I/18	Este estudo	Este estudo
CRMRS39*	Pimentão	Chã Grande/PE	I/18	Este estudo	Este estudo
CRMRS42*	Pimentão	Caruaru/PE	I/18	Este estudo	Este estudo
CRMRS86*	Tomateiro	Camocim de S. Félix/PE	I/18	Este estudo	Este estudo
CRMRS87*	Tomateiro	Camocim de S. Félix/PE	I/18	Este estudo	Este estudo
CRMRS88*	Tomateiro	Camocim de S. Félix/PE	I/18	Este estudo	Este estudo
CRMRS90*	Tomateiro	Camocim de S. Félix/PE	I/18	Este estudo	Este estudo
CRMRS95*	Tomateiro	Camocim de S. Félix/PE	I/18	Este estudo	Este estudo
CRMRS96*	Tomateiro	Camocim de S. Félix/PE	I/18	Este estudo	Este estudo
CRMRS97*	Tomateiro	Camocim de S. Félix/PE	I/18	Este estudo	Este estudo
CRMRS117*	Tomateiro	Gravatá/PE	I/18	Este estudo	Este estudo
IBSBF 455	Batata	Brasil	II	ND	ND
V34	Pimenta de cheiro	Benjamin Constant/AM	II	ND	ND
CRMRS50	Pimentão	Chã Grande/PE	II	ND	ND
V51	Maria-pretinha	Ariau/AM	II	ND	ND
V2	Tomateiro	Benjamin Constant/AM	II	ND	ND
V24	Tomateiro	Leticia/CO	II	ND	ND
V44*	Pepino	S. Gabriel Cachoeira/AM	II/ND	Este estudo	Este estudo
CRMRS107*	Tomateiro	Camocim de S. Félix/PE	II/ND	Este estudo	Este estudo
V23*	Tomateiro	Itacoatiara/AM	II/ND	Este estudo	Este estudo
IB2570*	Banana	Neópolis/SE	IIA-53 <sup>z</sup>	Este estudo	Este estudo
SFC 21*	Banana	Neópolis/SE	IIA-53 <sup>z</sup>	Este estudo	Este estudo
CRMRS92*	Tomateiro	Camocim de S. Félix/PE	IIA-54 <sup>z</sup>	Este estudo	Este estudo
CRMRS94*	Tomateiro	Camocim de S. Félix/PE	IIA-54 <sup>z</sup>	Este estudo	Este estudo
CRMRS101*	Tomateiro	Camocim de S. Félix/PE	IIA-54 <sup>z</sup>	Este estudo	Este estudo
CRMRS106*	Tomateiro	Camocim de S. Félix/PE	IIA-54 <sup>z</sup>	Este estudo	Este estudo
B97*	Banana	Alto Solimões/AM	IIA-55 <sup>z</sup>	Este estudo	Este estudo
CRMRS85*	Berinjela	Chã Grande/PE	IIA-55 <sup>z</sup>	Este estudo	Este estudo
FIO181C2*	Berinjela	Parintins/AM	IIA-55 <sup>z</sup>	Este estudo	Este estudo
CRMRS 44*	Pimentão	Caruaru /PE	IIA-55 <sup>z</sup>	Este estudo	Este estudo
V6*	Tomateiro	Tefé/AM	IIA-55 <sup>z</sup>	Este estudo	Este estudo
V17*	Tomateiro	Humaitá/AM	IIA-55 <sup>z</sup>	Este estudo	Este estudo
V28*	Tomateiro	Parintins/AM	IIA-55 <sup>z</sup>	Este estudo	Este estudo
V42*	Jiló	S. Gabriel Cachoeira/AM	IIA-56 <sup>z</sup>	Este estudo	Este estudo
V35*	Pimenta de cheiro	Coari/AM	IIA-56 <sup>z</sup>	Este estudo	Este estudo
V8*	Tomateiro	Irاندuba/AM	IIA-57 <sup>z</sup>	Este estudo	Este estudo
IBSBF143*	Batata	Araucária, PR	IIB-1	Este estudo	Este estudo
IBSBF40*	Batata	Piedade, SP	IIB-1	Este estudo	Este estudo

508 \*Isolados selecionados para estudos de perfil bioquímico, patogenicidade a tomate, pimentão e batata, e análise

509 filogenética.

510 <sup>y</sup>ND = Não determinado.

511 <sup>z</sup>Novas sequevares.

512 Tabela 2. Isolados de referência utilizados neste estudo

ISOLADOS <sup>x</sup>	HOSPEDEIRO	ORIGEM	FILOTIPO/ SEQUEVAR	GenBank	
				<i>egl</i>	<i>mutS</i>
K60 <sup>Ty</sup>	Tomate	EUA	IIA-7	EF192970.1	AY756799.1
CMR134	Mirtilo	Camarões	I-13	EF439740	EF439794
PSS81	Tomate	Taiwan	I-14	FJ561066	JF702701
PSS358	Tomate	Taiwan	I-15	EU407298	JF702699
ACH92	Gengibre	Austrália	I-16	AF295254	AY756764
P11	Amendoim	China	I-17	FJ561068	JF702705
GMI1000	Tomate	Guiana Francesa	I-18	AF295251	AY756804
JT519	Geranium	Reunião	I-31	GU295032	JF702713
PSS175	Perilla	Taiwan	I-32	KF913847	ND <sup>z</sup>
PSS219	Tomate	Taiwan	I-34	FJ561167	JF702700
O3	Oliveira	China	I-44	FJ561069	JF702706
CIP365	Batata	Filipinas	I-45	GQ907151	AY756787
MAD17	Pimentão	Madagascar	I-46	GU295040	ND
GMI8254	Tomate	Indonésia	I-47	GU295014	JF702719
M2	amora	China	I-48	FJ561067	ND
IBSBF1900	Banana	Brasil	IIA-24	EF371839	EF371871
CIP301	Batata	Peru	IIA-35	AF295264	AY756807
CFBP2957	Tomate	Martinica	IIA-36	AF295265	EF371845
CIP120	Batata	Peru	IIA-38	GQ907152	AY756774
CFBP2958	Tomate	Guadalupe (FWI)	IIA-39	AF295266	AY756806
UW469	Batata	Brasil	IIA-40	DQ657612	AY756808
CMR39	Tomate	Camarões	IIA-41	EF439726	EF439803
T1-UY	Tomate	Uruguai	IIA-50	GU295049	JF702712
CMR121	Tomate	Camarões	IIA-52	EF439725	EF439800
UW181	Plátano	Venezuela	IIA-6	GU295053	AY756754
ICMP7963	Batata	Quênia	IIA-7	AF295263	AY766776
JT516	Batata	Reunião	IIB-1	AF295258	AY756783
UW477	Batata	Peru	IIB-25	AY756821	ND
CIP240	Batata	Brasil	IIB-26	EF647739	JF702714
ISBSF1712	Geranium	Brasil	IIB-27	EF371833	EF371869
NCPB3987	Batata	Brasil	IIB-28	AF295261	AY756785
UW163	Plátano	Peru	IIB-4	GU295052	AY756779
CFBP6783	Heliconia	Martinica	IIB-4NPNB	EF371852	EF371852
ANT24	Anthurium	Trindade	IIB-51	AF371831	EF371875
JT525	Geranium	Reunião	III-19	AF295272	AY756786
CFBP6941	Tomato	Camarões	III-29	EF439743	JF702729
J25	Tomate	Quênia	III-20	AF295279	AY756810
NCPB1018	Batata	Angola	III-21	AF295271	AY756772
NCPB332	Batata	Zimbábue	III-22	AF295276	AY756760
CFBP3059	Berinjela	Burkina Faso	III-23	AF295270	AY756766
DGBBC1227	Batata	Guiné	III-42	GU295011	ND
DGBBC1125	Batata	Guiné	III-43	GU295008	ND
PSi7	Tomate	Indonésia	IV-10	EF371804	AY756752
ACH732	Tomate	Austrália	IV-11	GQ907150	AY756743
MAFF301558	Batata	Japão	IV-8	DQ011558	AY756812
R28 (RSY)	Cravo	Indonésia	IV-9	JF702321	JF702735

513 <sup>x</sup>Isolados de referência obtidos do GenBank utilizados para determinação de sequevares em árvores  
514 filogenéticas.

515 <sup>y</sup>Isolado tipo de *Ralstonia solanacearum* (K60<sup>T</sup> = ATCC11696 = IBSBF292).

516 <sup>z</sup>ND = Não determinado

517 Referência para determinação sequevares: Fegan e Prior (13) e Wicker et al. (38)

518 Tabela 3. Patogenicidade a batata, pimentão e tomate de isolados de *Ralstonia solanacearum*  
 519 obtidos das regiões Norte e Nordeste do Brasil, avaliada durante 15 dias após a inoculação

ISOLADOS	Hospedeiro de origem	Filotipo	Batata	Pimentão	Tomate
CRMRS53	Berinjela	I	+ <sup>z</sup>	+	+
CRMRS54	Berinjela	I	+	+	+
CRMRS56	Berinjela	I	+	+	+
CRMRS60	Berinjela	I	-	-	+
CRMRS61	Berinjela	I	+	-	+
CRMRS63	Berinjela	I	+	+	+
CRMRS69	Berinjela	I	-	+	+
CRMRS70	Berinjela	I	+	-	+
CRMRS83	Berinjela	I	+	-	+
CRMRS74	Jiló	I	+	+	+
CRMRS76	Jiló	I	+	+	+
CRMRS77	Jiló	I	+	+	+
CRMRS78	Jiló	I	+	+	+
CRMRS79	Jiló	I	+	+	+
CRMRS80	Jiló	I	+	+	+
CRMRS34	Pimentão	I	-	-	+
CRMRS39	Pimentão	I	+	-	+
CRMRS42	Pimentão	I	+	-	+
CRMRS117	Tomateiro	I	+	+	+
CRMRS86	Tomateiro	I	+	-	+
CRMRS87	Tomateiro	I	+	+	+
CRMRS88	Tomateiro	I	+	+	+
CRMRS90	Tomateiro	I	+	+	+
CRMRS95	Tomateiro	I	+	+	+
CRMRS96	Tomateiro	I	+	+	+
CRMRS97	Tomateiro	I	-	-	+
B97	Banana	II	+	-	+
IB2570	Banana	II	+	-	+
SFC 21	Banana	II	-	-	+
IBSBF40	Batata	II	+	+	+
IBSBF143	Batata	II	+	-	+
FIO181C2	Berinjela	II	+	-	+
CRMRS85	Berinjela	II	+	-	+
V42	Jiló	II	+	+	+
V44	Pepino	II	+	-	+
V35	Pimenta de cheiro	II	+	-	+
CRMRS 44	Pimentão	II	+	-	+
V6	Tomateiro	II	-	-	+
V8	Tomateiro	II	-	-	+
V17	Tomateiro	II	-	-	+
V23	Tomateiro	II	+	-	+
V28	Tomateiro	II	+	-	+
CRMRS92	Tomateiro	II	+	+	+
CRMRS94	Tomateiro	II	-	-	+
CRMRS101	Tomateiro	II	+	+	+
CRMRS106	Tomateiro	II	-	-	+
CRMRS107	Tomateiro	II	+	-	+
K60	Tomateiro	II	+	-	+

520 <sup>z</sup>+ = pelo menos duas plantas com sintomas de murcha no total de dez plantas inoculadas.

521  
522  
523  
524  
525  
526  
527  
528  
529  
530  
531  
532  
533  
534  
535  
536  
537  
538  
539  
540  
541  
542  
543  
544  
545  
546  
547  
548  
549  
550  
551  
552  
553  
554  
555  
556

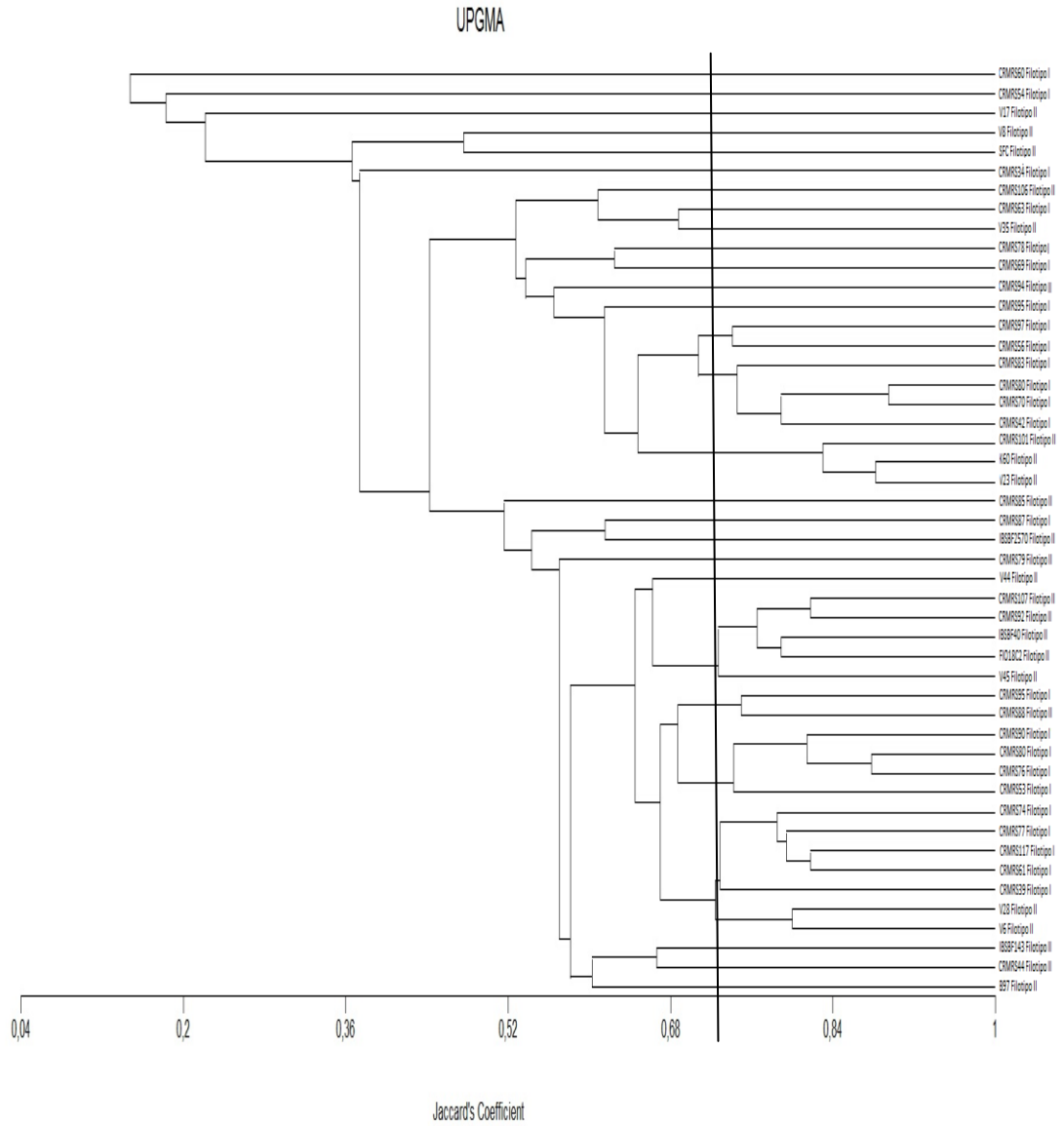


Figura 1. Perfil bioquímico de isolados de *Ralstonia solanacearum* utilizando o sistema Biolog GENIII. Dendrograma construído pelo método UPGMA utilizando o software MVSP (3.2.).

557  
558  
559  
560  
561  
562  
563  
564  
565  
566  
567  
568  
569  
570  
571  
572  
573  
574  
575  
576  
577  
578  
579  
580  
581  
582  
583  
584  
585  
586  
587  
588  
589  
590  
591  
592  
593  
594  
595  
596  
597  
598  
599



600 Figura 2. Análise filogenética de seqüências parciais do gene *egl* de isolados de *Ralstonia*  
601 *solanacearum*. Relacionamento filogenético determinado pelo método de Máxima  
602 Verossimilhança. Valores dos ramos indicam porcentagem de *bootstraps* para 1000  
603 repetições. Isolados deste estudo: ●isolados de batata, ○ isolados da região Norte e ▲  
604 isolados da região Nordeste. Números após o país de origem indicam sequevares já  
605 determinados. A barra representa uma substituição em 100 nucleotídeos.  
606

607  
608  
609  
610  
611  
612  
613  
614  
615  
616  
617  
618  
619  
620  
621  
622  
623  
624  
625  
626  
627  
628  
629  
630  
631  
632  
633  
634  
635  
636  
637  
638  
639  
640  
641  
642  
643  
644  
645  
646  
647  
648  
649  
650  
651  
652  
653  
654  
655  
656  
657

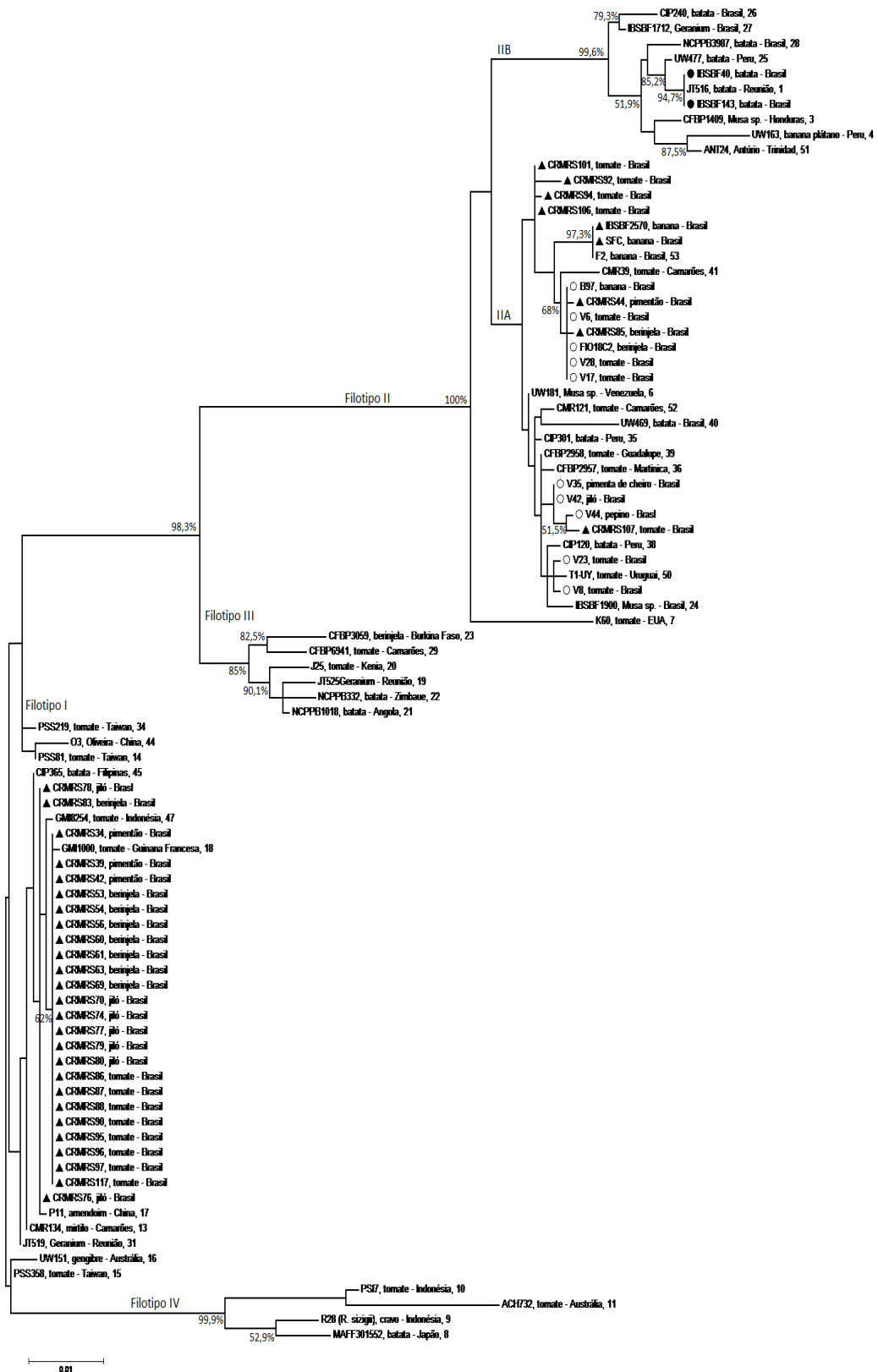


Figura 3. Análise filogenética de sequências concatenadas dos genes *egl* e *mutS* de isolados de *Ralstonia solanacearum*. Relacionamento filogenético determinado pelo método de Máxima Verossimilhança. Valores dos ramos indicam porcentagem de *bootstraps* para 1000 repetições. Isolados deste estudo: ●isolados de batata, ○ isolados da região Norte e ▲ isolados da região Nordeste. Números após o país de origem indicam sequevares já determinados. A barra representa uma substituição em 100 nucleotídeos.

## **CONCLUSÕES GERAIS**



## CONCLUSÕES GERAIS

1. Os filotipos I e II de *Ralstonia solanacearum* estão presentes na região Nordeste, enquanto que na região Norte só foi encontrado o filotipo II.
2. Existe alta diversidade bioquímica entre os isolados de *R. solanacearum* pertencentes aos filotipos I e II.
3. Isolados de *R. solanacearum* oriundos de vários hospedeiros foram patogênicos a batata, pimentão e tomate, evidenciando baixa diversidade patogênica.
4. Existe baixa diversidade genética no filotipo I no Nordeste e alta diversidade no filotipo II nas regiões Norte e Nordeste do Brasil.
5. Cinco sequevares já conhecidas do complexo *R. solanacearum* foram encontradas em isolados das regiões Norte e Nordeste do Brasil.
6. Alguns isolados formaram grupos não descritos para o complexo *R. solanacearum*, sendo sugerida a criação das sequevares IIA-54, IIA-55 e IIA-56.