

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA, PATOGÊNICA E
MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Ralstonia solanacearum*
BIOVAR 2 DE BATATA E BERINJELA**

JOSÉ MAGNO MARTINS BRINGEL

**Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”,
Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em
Agronomia, Área de Concentração:
Fitopatologia**

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo - Brasil
Setembro - 2002

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA, PATOGÊNICA E
MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Ralstonia solanacearum*
BIOVAR 2 DE BATATA E BERINJELA**

JOSÉ MAGNO MARTINS BRINGEL

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. **IVAN PAULO BEDENDO**

Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”,
Universidade de São Paulo, para obtenção
do título de Doutor em Agronomia, Área
de Concentração: Fitopatologia

Estado de São Paulo - Brasil

Setembro - 2002

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Bringel, José Magno Martins

Caracterização bioquímica, patogênica e molecular de isolados de *Ralstonia solanacearum* Biovar 2 de batata e berinjela / José Magno Martins Bringel. - - Piracicaba, 2002.

103 p. : il.

Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2002.
Bibliografia.

1. Bactéria fitopatogênica 2. Batata 3. Berinjela 4. Diversidade genética 5. Mur-
cha-bacteriana 6. Relação hospedeiro-patógeno I. Título

CDD 633.491

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

**“Deus, dai-me serenidade para aceitar o que não posso mudar,
coragem para mudar o que pode ser mudado e sabedoria para
distinguir uma coisa da outra”**

Oração da Serenidade

**A minha mãe Maria de Lourdes Cunha Martins e minha filha Luanna
Bárbara Soares do Montes Martins Bringel, faço de minha conquista
o instrumento de gratidão, respeito, amor, carinho, compreensão e
reconhecimento que recebi.**

Dedico

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, ao Criador, pela presença constante de luz em minha vida.

À ESALQ/USP pela oportunidade de progredir e aos professores do Curso de Pós-graduação em Fitopatologia, pelos ensinamentos transmitidos e pelo exemplo de profissionalismo.

Em especial ao Prof. Dr. Ivan Paulo Bedendo por seus ensinamentos, pela valiosa orientação, confiança e incentivo.

À Dra. Patrícia Messenberg Guimarães e ao Prof. Dr Carlos Alberto Lopes, pela cooperação, atenção, sugestões e observações.

Ao Prof. Dr. Gilson Soares da Silva que, além de amigo, sempre me incentivou à pesquisa.

À CAPES e à Universidade Estadual do Maranhão - UEMA, pela concessão da bolsa de estudos.

À Embrapa-Cenargen e à Embrapa-Hortaliças, por terem tornado possível a realização deste trabalho.

A amiga e irmã Marta Luriko Nishijima, pelo carinho e atenção.

Ao amigo Dr. Ramatis Monteiro Aguiar pelo apoio constante.

Aos grandes amigos que aqui conquistei e que, com carinho, compreensão, amizade e amor, contribuíram para a realização desta etapa de minha vida: Alice Maria, Adriana, Andréia, Célia Malvas, Elisa,

Fernanda, Hélio, Heloisa, Jeferson, Kátia, Nil, Paulinho, Paulo Celso, Regina, Roberto, Rodolfo e Salvador.

Aos amigos Carol, Denise, Marquinhos, Mauro, João, José Carlos, Roberta, Sileuza e Vilemar pela agradável convivência e carinho.

À minha família pela presença constante em minha vida.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xiv
RESUMO.....	xvi
SUMMARY.....	xviii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1 A murcha bacteriana.....	5
2.2 O patógeno.....	14
2.2.1 Classificação de <i>Ralstonia solanacearum</i>	14
2.2.2 Caracterização fenotípica (morfológicas, fisiológicas e quimiotaxonômicas).....	16
2.2.3 Caracterização genotípica.....	18
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 Obtenção de isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i>	25

3.2	Padronização de idade dos isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i> biovar 2.....	28
3.3	Caracterização dos isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i>	29
3.3.1	Morfológica.....	29
3.3.1.1	Avaliação dos aspectos culturais de <i>Ralstonia solanacearum</i> biovar 2 em meio de cultura.....	29
3.3.2	Bioquímica.....	30
3.3.2.1	Teste de oxidação-fermentação (OF ou teste de crescimento anaeróbico).....	30
3.3.2.2	Utilização de asparagina como fonte única de carbono e nitrogênio.....	31
3.3.2.3	Produção de pigmentação fluorescente em meio King.....	31
3.3.2.4	PBHB (Coloração de grânulos de poli- β -Hidroxibutirato)....	32
3.3.2.5	Classificação dos isolados em biovars.....	33
3.3.3	Agressividade.....	34
3.3.3.1	Avaliação da agressividade de isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i> biovar 2 em berinjela e batata.....	34
3.3.3.2	Avaliação do desenvolvimento de isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i> biovar 2 na rizosfera de plantas de batata e berinjela, <i>in vitro</i>	39
3.3.4	Resistência a antibióticos e fungicidas.....	43
3.3.4.1	Obtenção de variantes de isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i> biovar 2 com resistência múltipla a antibióticos.....	43
3.3.4.2	Obtenção de variantes de isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i> biovar 2 com resistência múltipla a antibióticos e fungicidas.....	44

3.3.4.3 Avaliação do desenvolvimento da população de isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i> biovar 2 em raízes de plantas de batata e berinjela cultivadas em vasos.....	45
3.3.5 Caracterização molecular de <i>Ralstonia solanacearum</i> biovar 2.....	47
3.3.5.1 Extração de DNA.....	47
3.3.5.1.2 Preparo dos isolados.....	47
3.3.5.1.3 Extração do DNA genômico.....	47
3.3.5.1.4 Condições de PCR.....	48
4 RESULTADOS.....	51
4.1 Obtenção de isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i>	51
4.2 Padronização de idade dos isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i> biovar 2.....	51
4.3 Avaliação dos aspectos culturais de <i>Ralstonia solanacearum</i> biovar 2 em meio de cultura.....	52
4.4 Teste de oxidação-fermentação (OF ou teste de crescimento anaeróbico).....	55
4.5 Utilização de asparagina como fonte única de carbono e nitrogênio, produção de pigmentação fluorescente em meio King e PBHB (coloração de grânulos de poli- β -hidroxibutirato).....	56
4.6 Classificação dos isolados em biovars.....	56
4.7 Avaliação da agressividade de isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i> biovar 2 em berinjela e batata.....	57
4.8 Avaliação do desenvolvimento de isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i> biovar 2 na rizosfera de plantas de batata e berinjela, <i>in vitro</i>	61

4.9 Obtenção de variantes do isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i> biovar 2 com resistência múltipla a antibióticos e fungicidas.....	62
4.10 Avaliação do desenvolvimento da população de isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i> biovar 2 em raízes de plantas de batata e berinjela cultivadas em vasos.....	62
4.11 Análise de seqüências repetitivas de DNA amplificadas com os iniciadores ERIC, BOX e REP (rep-PCR).....	65
5 DISCUSSÃO.....	75
5.1 Caracterização dos isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i> biovar 2 quanto aos aspectos morfológicos e bioquímicos.....	75
5.2 Avaliação da patogenicidade de isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i> biovar 2 em berinjela e batata.....	76
5.3 Avaliação do desenvolvimento de isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i> biovar 2 na rizosfera de plantas de batata e berinjela, <i>in vitro</i>	77
5.4 Avaliação do desenvolvimento da população de isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i> biovar 2 em raízes de plantas de batata e berinjela cultivadas em vasos.....	78
5.5 Análise de seqüências repetitivas de DNA amplificadas com os iniciadores ERIC, BOX e REP (rep-PCR).....	81
6 CONCLUSÕES.....	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Esquema de inoculação de <i>Ralstonia solanacearum</i> em berinjela (Morgado et al, 1994).....	37
2 Esquema de inoculação de <i>Ralstonia solanacearum</i> em batata (Lopes, 1981).....	38
3 Escala diagramática para avaliação do desenvolvimento de isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i> na rizosfera de batata e berinjela <i>in vitro</i> (Bringel et al, 2001b).....	42
4 Variação na produção de melanina entre os isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i>	55
5 Desenvolvimento vegetativo atípico em planta de batata provocado pelo isolado CNPH - 65 de <i>Ralstonia solanacearum</i> obtido de batata.....	59
6 Perfis eletroforéticos obtidos pela amplificação de fragmentos de DNA de isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i> , através de PCR,	

utilizando o iniciador BOX. Os isolados estão representados da esquerda para direita (1 = CNPH - 141, 2 = CNPH - 153, 3 = CNPH - 154, 4 = CNPH - 156, 5 = CNPH - 157, 6 = CNPH - 164, 7 = CNPH - 94, 8 = CNPH - 96, 9 = CNPH - 98, 10 = CNPH - 95, 11 = CNPH - 97, 12 = CNPH - 115, 13 = CNPH - 111, 14 = CNPH - 113, 15 = CNPH - 65, 16 = CNPH - 120, 17 = CNPH - 66, 18 = CNPH - 67, 19 = CNPH - 68, 20 = CNPH - 69, 21 = CNPH - 70, 22 = CNPH - 165, 23 = CNPH - 90, 24 = CNPH - 91, 25 = CNPH - 92, 26 = CNPH - 44, 27 = CNPH - 57, 28 = CNPH - 82, 29 = CNPH - 84, 30 = CNPH - 87, 31 = CNPH - 89, 32 = CNPH - 2, 33 = CNPH - 71, 34 = CNPH - 83, 35 = CNPH - 77, 36 = CNPH - 79, 37 = CNPH - 81, 38 = CNPH - 138, 39 = CNPH - 139, 40 = CNPH - 140, 41 = CNPH - 162, 42 = CNPH - 173, 43 = CNPH - 130, 44 = CNPH - 131, 45 = CNPH - 133, 46 = CNPH - 134, 47 = CNPH - 135, 48 = CNPH - 137, 49 = CNPH - 132, 50 = CNPH - 99, 51 = CNPH - 107). Primeira e última coluna marcador molecular 1 Kb DNA Ladder..... 68

7 Perfis eletroforéticos obtidos pela amplificação de fragmentos de DNA de isolados de *Ralstonia solanacearum*, através de PCR, utilizando o iniciador ERIC. Os isolados estão representados da esquerda para direita (1 = CNPH - 141, 2 = CNPH - 153, 3 = CNPH - 154, 4 = CNPH - 156, 5 = CNPH - 157, 6 = CNPH - 164, 7 = CNPH - 94, 8 = CNPH - 96, 9 = CNPH - 98, 10 = CNPH - 95, 11 = CNPH - 97, 12 = CNPH - 115, 13 = CNPH - 111, 14 = CNPH - 113, 15 = CNPH - 65, 16 = CNPH - 120, 17 = CNPH - 66, 18 = CNPH - 67, 19 = CNPH - 68, 20 = CNPH - 69, 21 = CNPH - 70, 22 = CNPH - 165, 23 = CNPH - 90, 24 = CNPH - 91, 25 = CNPH - 92, 26 = CNPH - 44, 27 = CNPH - 57, 28 = CNPH -

82, 29 = CNPH - 84, 30 = CNPH - 87, 31 = CNPH - 89, 32 = CNPH - 2, 33 = CNPH - 71, 34 = CNPH - 83, 35 = CNPH - 77, 36 = CNPH - 79, 37 = CNPH - 81, 38 = CNPH - 138, 39 = CNPH - 139, 40 = CNPH - 140, 41 = CNPH - 162, 42 = CNPH - 173, 43 = CNPH - 130, 44 = CNPH - 131, 45 = CNPH - 133, 46 = CNPH - 134, 47 = CNPH - 135, 48 = CNPH - 137, 49 = CNPH - 132, 50 = CNPH - 99, 51 = CNPH - 107). Primeira e última coluna marcador molecular 1 Kb DNA Ladder..... 69

8 Perfis eletroforéticos obtidos pela amplificação de fragmentos de DNA de isolados de *Ralstonia solanacearum*, através de PCR, utilizando o iniciador REP. Os isolados estão representados da esquerda para direita (1 = CNPH - 141, 2 = CNPH - 153, 3 = CNPH - 154, 4 = CNPH - 156, 5 = CNPH - 157, 6 = CNPH - 164, 7 = CNPH - 94, 8 = CNPH - 96, 9 = CNPH - 98, 10 = CNPH - 95, 11 = CNPH - 97, 12 = CNPH - 115, 13 = CNPH - 111, 14 = CNPH - 113, 15 = CNPH - 65, 16 = CNPH - 120, 17 = CNPH - 66, 18 = CNPH - 67, 19 = CNPH - 68, 20 = CNPH - 69, 21 = CNPH - 70, 22 = CNPH - 165, 23 = CNPH - 90, 24 = CNPH - 91, 25 = CNPH - 92, 26 = CNPH - 44, 27 = CNPH - 57, 28 = CNPH - 82, 29 = CNPH - 84, 30 = CNPH - 87, 31 = CNPH - 89, 32 = CNPH - 2, 33 = CNPH - 71, 34 = CNPH - 83, 35 = CNPH - 77, 36 = CNPH - 79, 37 = CNPH - 81, 38 = CNPH - 138, 39 = CNPH - 139, 40 = CNPH - 140, 41 = CNPH - 162, 42 = CNPH - 173, 43 = CNPH - 130, 44 = CNPH - 131, 45 = CNPH - 133, 46 = CNPH - 134, 47 = CNPH - 135, 48 = CNPH - 137, 49 = CNPH - 132, 50 = CNPH - 99, 51 = CNPH - 107). Primeira e última coluna marcador molecular 1 Kb DNA Ladder..... 70

9	Dendrograma construído com base no coeficiente de similaridade obtido pelo iniciador BOX.....	71
10	Dendrograma construído com base no coeficiente de similaridade obtido pelo iniciador ERIC.....	72
11	Dendrograma construído com base no coeficiente de similaridade obtido pelo iniciador REP.....	73
12	Dendrograma construído com base no coeficiente de similaridade obtido pelos iniciadores BOX, REP e ERIC.....	74

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Origem dos isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i> biovar 2.....	26
2 Caracterização de biovares de <i>Ralstonia solanacearum</i> , segundo Hayward (1964).....	34
3 Composição do meio Murashige & Skoog (1962).....	40
4 Características culturais de <i>isolados de Ralstonia solanacearum</i> em meio de cultura 523, avaliados 48 h após repicagem.....	53
5 Classificação dos isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i> em biovares.....	57
6 Agressividade de isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i> biovar 2, avaliada em dois genótipos de batata e berinjela, medida aos 5 e 10 dias após a inoculação.....	60
7 Desenvolvimento da população de <i>Ralstonia solanacearum</i> no sistema radicular de plantas de batata e berinjela, inoculadas	

com 51 isolados do patógeno pertencentes à biovar 2 e avaliado na forma de unidade formadora de colônia por peso de raiz (ufc/g).....	63
8 Agrupamento dos isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i> de acordo com os padrões de bandas de fragmentos de DNA genômico amplificado, obtidos com os iniciadores ERIC, BOX e REP.....	67

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA, PATOGÊNICA E MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Ralstonia solanacearum* BIOVAR 2 DE BATATA E BERINJELA

Autor: JOSÉ MAGNO MARTINS BRINGEL
Orientador: Prof. Dr. IVAN PAULO BEDENDO

RESUMO

A murcha bacteriana, causada por *Ralstonia solanacearum*, afeta principalmente as solanáceas, destacando-se as culturas da batata, berinjela, jiló, pimentão e tomate. No presente trabalho foi conduzida a caracterização molecular de isolados de *R. solanacearum* e sua possível relação com características relacionadas à morfologia, bioquímica, patogenicidade, agressividade e distribuição geográfica. Foram utilizados 51 isolados pertencentes à biovar 2, sendo 9 provenientes de berinjela e 42 de batata, coletados em diversas regiões brasileiras. A análise molecular permitiu separar os isolados em quatro grupos distintos de padrões de bandas para os iniciadores BOX e ERIC, e em cinco para o iniciador REP. Não foi encontrada relação dos grupos de isolados caracterizados molecularmente com tamanho de colônias, ocorrência de mutantes, produção de melanina, capacidade de colonização do sistema radicular e resistência a antibióticos/fungicidas. A identificação de isolados de batata, como biovar 2-A, e de berinjela, como biovar 2-T,

com base em teste bioquímico do uso de trealose, foi confirmadas pela análise molecular. Não houve variação de agressividade entre os isolados inoculados em batata e berinjela, exceção feita ao isolado avirulento CNPH-65. Portanto, isolados das biovares 2-A e 2-T podem infectar estas duas hospedeiras com a mesma intensidade sob altas temperaturas. Para todos os isolados, o desenvolvimento da população bacteriana foi significativamente maior no sistema radicular de plantas das cultivares suscetíveis, tanto para batata como para berinjela. No entanto, dentro de cada cultivar, os isolados se comportaram de maneira semelhante, não sendo possível fazer distinção entre os mesmos. A tentativa de se associar grupos de isolados caracterizados molecularmente com os locais de origem revelou alguns aspectos interessantes. O grupo I agregou somente isolados do Paraná. No grupo II ficaram isolados da Bahia, Distrito Federal e do Paraná. No Grupo III, foram reunidos todos os isolados de berinjela e um único de batata, sendo todos procedentes do Distrito Federal. O grupo IV, de forma semelhante ao grupo II, reuniu isolados de locais diversos como Paraná, Goiás, Rio Grande do Sul e Distrito Federal. Portanto, nos grupos I e III parece haver uma tendência de relação entre grupamento molecular e local de origem, enquanto que para os grupos II e IV, isolados de características genéticas similares são provenientes de locais distintos, apontando considerável diversidade genética do patógeno.

**BIOCHEMICAL, PATHOGENIC AND MOLECULAR
CHARACTERIZATION OF *Ralstonia solanacearum* BIOVAR 2
ISOLATES OF POTATO AND EGGPLANT**

Author: JOSÉ MAGNO MARTINS BRINGEL
Adviser: Prof. Dr. IVAN PAULO BEDENDO

SUMMARY

The bacterial wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum* affects mainly the solanaceous species, specially potato, eggplant, peppers, tomato and brazilian gilo (*Solanum gilo*). This work reports the molecular characterization of *R. solanacearum* biovar 2 isolates and the possible relationship of this molecular data with other characteristics related to morphology, biochemistry, pathogenicity, aggressiveness and geographical distribution. Fifty-one biovar 2 isolates were studied, 9 isolated from eggplant and 42 from potato, all of them collected from different regions of Brazil. According to the molecular analysis, the isolates were clustered in four different groups, with distinct band patterns to the primers BOX and ERIC, and five groups to the primers REP. There was no relationship between the groups clustered through molecular analyses and phenotypic characteristics, such as colony size, presence of mutants, melanin presence, capability of root system

colonization and antibiotic/fungicide resistance. The identification of potato isolates as the biovar 2-A, and the eggplant isolates as biovar 2-T, based on biochemical tests using trealose were confirmed with the molecular analyses. There was no variation of aggressiveness in the isolates inoculated on potato and eggplant, except the avirulent isolate CNPH-65. Consequently, isolates of biovars 2-A and 2-T are able to infect both hosts with the same aggressiveness under high temperatures. The population of all isolates developed in significant levels at the root system of susceptible cultivars of both hosts, potato and eggplant. However, considering each cultivar tested, there was no difference between isolates. Interesting results were observed when the isolates clustered based on molecular data were associated with the geographical region of their collection. The group I clustered only the isolates collected in Paraná. The group II clustered the isolates collected in Bahia, Federal District and some in Paraná. The group III clustered all isolates from eggplant and only one of potato, all of them collected in the Federal District. The group IV, as the group II, clustered isolates from different regions, like Paraná, Goiás, Rio Grande do Sul and Federal District. These results suggest a relationship between the isolates clustered through molecular analysis in the groups II and III and their geographical region of collection. The isolates clustered in the same way, with similar genetic background in the groups II and IV, were however collected in different regions, showing the great genetic variation of this pathogen.

1 INTRODUÇÃO

A murcha bacteriana, causada por *Ralstonia solanacearum*, é considerada a principal doença vascular de etiologia bacteriana encontrada no mundo, especialmente nas regiões tropicais onde infecta plantas pertencentes a mais de 44 famílias botânicas (Hayward, 1991). Pelo fato deste patógeno atuar no sistema vascular, ser habitante do solo e estar associado a um grande número de espécies botânicas, o controle da doença se torna extremamente difícil (Lopes & Reifschneider, 1999).

Dentre as espécies vegetais de importância econômica atacadas pela doença, estão algumas pertencentes à família das solanáceas como batata, pimentão, tomate, berinjela e fumo. No Brasil, a murcha bacteriana é um fator de risco para a produção de batata em todas as áreas onde ela é cultivada, sendo que, para as demais solanáceas, a doença tem grande incidência nas regiões tropicais de baixa altitude do Nordeste, do Centro Oeste e em toda a região Amazônica (Takatsu & Lopes, 1997).

R. solanacearum é uma bactéria cosmopolita e a dificuldade em se desenvolver estratégias de controle da murcha tem sido atribuída, em grande parte, à falta de conhecimentos básicos sobre a ecologia e a evolução deste fitopatógeno (Lopes, 1994a; Cook & Sequeira, 1994). Centenas de espécies de plantas são relatadas como hospedeiras

suscetíveis (Hayward, 1994), sendo pouco conhecido a que estirpes do patógeno estas espécies são suscetíveis. A ausência desta informação torna difícil o estabelecimento das relações patógeno-hospedeiro, já que uma planta pode ser hospedeira de uma ou mais estirpes do patógeno, tornando problemática a escolha de culturas a serem utilizadas em programas de rotação. Ainda, a falta de conhecimento sobre as estirpes existentes em uma determinada área, dificulta e, às vezes, torna inviável a seleção de genótipos resistentes em programas de melhoramento.

A utilização de técnicas moleculares como RFLP (Gillings & Fahy, 1994), PCR (Seal et al., 1992; Smith et al., 1995; Restrepo et al., 2000) e Pulsed-Field Gel Electrophoresis (Smith et al., 1995) tem contribuído para elucidar as relações existentes dentro da espécie de *R. solanacearum* e também para demonstrar que a espécie é altamente complexa e heterogênea.

Apesar do grande número de dados que têm sido obtidos nos últimos anos, especialmente na área de caracterização quimiotaxonômica e molecular do patógeno, poucos avanços foram registrados em relação à epidemiologia, não sendo ainda possível estabelecer estratégias adequadas e seguras de controle desta doença (Cook & Sequeira, 1994; Takatsu & Lopes, 1997). Esta situação se deve a inúmeros fatores, sendo os mais importantes a ampla distribuição da doença em toda faixa tropical e subtropical do globo terrestre, a existência de centenas de espécies hospedeiras sintomáticas e assintomáticas entre as plantas cultivadas, nativas e invasoras, a grande variabilidade do patógeno quanto à virulência, preferência por hospedeiras e a adaptabilidade às condições edafoclimáticas (Hayward, 1991; Morgado et al., 1992; Melo et al., 1999a)

Os avanços obtidos com as técnicas de identificação e caracterização de *R. solanacearum* nos últimos anos, especialmente através de métodos moleculares (Seal & Elphinstone, 1994; Cook & Sequeira, 1994; Gillings & Fahy, 1994; Martins, 2000; Restrepo et. al., 2000), têm contribuído para aumentar os conhecimentos sobre os aspectos evolutivos deste patógeno. A possibilidade de identificação de estirpes, no contexto epidemiológico, pode implementar a adoção de medidas de controle mais adequadas, fornecendo subsídios para estratégias de controle e para os trabalhos de melhoramento genético, visando a obtenção de cultivares resistentes. No caso específico de *R. solanacearum*, a utilização de marcadores tem contribuído amplamente para o estudo da evolução e variabilidade intra-específica (Cook & Sequeira, 1994; Smith et al., 1995; Martins, 2000). A análise de variantes coletados nas diversas regiões do mundo demonstrou que esta espécie tem evoluído em dois grandes grupos distintos, sendo um deles originário da Ásia e Austrália e o outro das Américas. O desenvolvimento de "fingerprints" genômicos de isolados de *R. solanacearum* biovar 2 originária da África, utilizando-se Rep-PCR (ERIC e BOX) e RC-PFGE, identificou tendências biogeográficas de disseminação do patógeno e revelou níveis de diversidade genética dentro do grupo até então desconhecido (Smith et al., 1995).

Dentre as várias subdivisões encontradas dentro de *R. solanacearum*, a raça 3 apresentou o menor nível de heterogeneidade. Estes resultados são consistentes com a classificação destes isolados em raças e biovars, pois a raça 3, sinônimo de biovar 2, apresentou o menor círculo de hospedeiras, sendo basicamente limitado a batata. A murcha bacteriana é um fator limitante em todas as áreas do Brasil onde a batata é cultivada, embora apenas a biovar 2 seja encontrada

infectando e causando danos (Lopes & Reifschneider, 1999). A caracterização de populações bacterianas ocorrentes em diferentes regiões geográficas é extremamente importante para o estudo da epidemiologia da doença e desenvolvimento de estratégias para seu controle. No Brasil, até o presente momento, nenhum estudo, ao nível molecular, tem sido desenvolvido objetivando a caracterização de isolados de *R. solanacearum* biovar 2 ocorrentes no país.

O presente trabalho teve como objetivo a caracterização molecular de isolados *R. solanacearum* biovar 2 coletados em diversas regiões brasileiras, visando o estudo de sua diversidade genética, e sua relação com níveis de agressividade e patogenicidade, aspectos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos, e sua distribuição geográfica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A murcha bacteriana

A murcha bacteriana foi relatada pela primeira vez nos Estados Unidos da América, em 1896, por Erwin F. Smith, afetando batata, tomate e berinjela (Hayward, 1994). No Brasil, a murcha bacteriana foi relatada por Von Parseval, em 1922, em fumo e batata, no estado do Rio Grande do Sul (Takatsu & Lopes, 1997). Grande número de informações sobre a ocorrência da doença em diversas espécies economicamente importantes foram divulgados no Brasil, desde o primeiro relato, refletindo a ampla distribuição do patógeno, bem como sua importância econômica (Takatsu & Lopes, 1997).

Lopes & Reifschneider (1999) constataram perdas causadas pela murcha bacteriana em batata, em todas as regiões do Brasil, onde esta solanácea é cultivada, com maiores proporções em campos de produção de batata-semente. Em tomate, pimentão, berinjela e jiló, as maiores perdas foram observadas nas regiões Norte e Nordeste e nas áreas de baixa altitude do Centro-Oeste.

A murcha bacteriana é largamente distribuída em todos os grandes continentes, ocorrendo na maioria das regiões tropicais, subtropicais e quente-temperadas (Hayward, 1994). É uma das doenças mais importantes de origem bacteriana no mundo, afetando várias espécies de plantas pertencentes a mais de 44 famílias botânicas

(Hayward, 1991). Entre estas, as solanáceas são as mais severamente afetadas, causando grandes perdas econômicas em culturas como batata, tomate, fumo, pimentão e berinjela. Amendoim, banana e gengibre são exemplos de espécies não pertencentes à família das solanáceas que podem ser também afetadas severamente pela murcha bacteriana (Lopes & Takatsu, 1997). A ampla distribuição da bactéria, bem como a ampla diversidade de hospedeiros, torna difícil a determinação de sua origem. Kelman et al. (1994), com base nos estudos feitos sobre o ciclo de hospedeiras, controle da doença através de rotação de culturas e interações parasita-hospedeiras, concluiu que populações de *R. solanacearum* evoluíram em diferentes regiões do mundo, em vários membros da flora nativa local.

Vários métodos de classificação da bactéria em nível subespecífico têm sido adotados, sendo esta diversidade atribuída à ampla distribuição geográfica, ao grande número de hospedeiras afetadas e às dificuldades na diferenciação de estirpes (Agrios, 1997; Hayward, 1994).

R. solanacearum é um patógeno que causa infecção vascular e murcha. O aparecimento da murcha, inicialmente nas folhas superiores, ocorre dentro de poucos dias nas plantas infectadas em condições favoráveis à doença (Akiew & Trevorrow, 1994). A epinastia dos pecíolos e o desenvolvimento de raízes adventícias são comuns em tomateiros infectados. As seções longitudinais do caule de plantas infectadas apresentam fluxo bacteriano caracterizado por exsudação de pus (Ferreira & Salgado, 1995; Agrios, 1997). As plantas infectadas que sobrevivem à murcha bacteriana apresentam nanismo, amarelecimento das folhas murchas e, às vezes, estrias escuras são formadas ao longo do caule e pecíolos (Goto, 1992). Entretanto, a expressão dos sintomas varia com o hospedeiro e com as condições ambientais.

As plantas infectadas com estirpes pouco agressivas não murcham, mas apresentam sintomas de nanismo e formação de raízes adventícias (Goto, 1992). Plantas suscetíveis murcham repentinamente, quando infectadas com estirpes altamente agressivas do patógeno (Grimault et al. 1994; Kelman et al., 1994). Buscando explicar o mecanismo de murcha, estes autores extraíram substâncias de tomateiros inoculados com estirpes altamente agressivas, de fraca agressividade e avirulentas. Através de ensaios realizados com filtrados destas substâncias, verificou-se que um polissacarídeo extracelular produzido pela estirpe altamente agressiva, e não pela estirpe avirulenta, foi o fator primário na indução da murcha. Este polissacarídeo aumentou a viscosidade do suco vascular, interferindo no movimento de água nos vasos.

French (1994) afirma que *R. solanacearum* pode ser considerado um verdadeiro patógeno do solo, por sua habilidade em sobreviver melhor em solos úmidos, decrescendo em alguns solos pela baixa tolerância à dessecação, aumento do antagonismo microbiano, exposição à luz solar e ausência de plantas invasoras hospedeiras. Além da habilidade de multiplicação rápida, a bactéria é, também, capaz de sobreviver por longos períodos no solo.

Glick (1995) verificou a sobrevivência de *R. solanacearum* raça 1, durante um período de 3 a 5 anos, após a rotação com diferentes culturas e pousio com plantas invasoras. A persistência de isolados das biovars 1 e 2 na rizosfera de helicônias e solanáceas foi verificada, sugerindo uma especificidade de associação mesmo que a doença não ocorra (French et al., 1993). O patógeno provavelmente sobrevive em solos por longos períodos na ausência de culturas suscetíveis, podendo entretanto, ocorrer declínio na produção, mesmo em solos cultivados com plantas resistentes (Lopes & Reifschneider, 1999). Aumento ou

declínio da população da bactéria ocorre na rizosfera e não-rizosfera de certas plantas invasoras e cultivadas. Algumas estirpes de *R. solanacearum* sobrevivem quase indefinidamente em alguns solos, mesmo sob condições de pousio, enquanto outras podem ser reduzidas por rotação de culturas ou pousio (Takatsu & Lopes, 1997). O conhecimento da sobrevivência no solo de *R. solanacearum* é de grande importância quando se tem como objetivo a rotação de culturas, cuja prática é a mais indicada para o controle da murcha bacteriana. A questão da sobrevivência de *R. solanacearum* deve ser analisada a partir da introdução do patógeno em uma determinada área onde ela não existia, bem como a partir da existência em locais presumivelmente livres desta bactéria (Viana, 1995; Melo et al., 1999a; Melo et al., 1999b). A incidência altamente variável da murcha no campo indica que fatores como tipo de solo, pH, umidade e presença de certas plantas, hospedeiras ou não, afetam a sobrevivência da bactéria (Hayward, 1994). Um estudo sobre a sobrevivência de *R. solanacearum* conduzido em casa de vegetação revelou que a raça 1 sobreviveu no solo por mais tempo do que a raça 2 e a raça 2 por mais tempo que a raça 3 (Goto, 1992). Segundo Hayward (1991) e Kelman et al., (1994), alta umidade do solo e baixa temperatura parecem favorecer a longa sobrevivência da bactéria no solo, o que sugere a persistência de *R. solanacearum* em função das camadas mais profundas do solo. A maioria dos relatos sugere que a bactéria sobrevive melhor sob condições de alta umidade. No entanto, embora altos níveis de umidade do solo favoreçam o seu desenvolvimento, a doença também ocorre em solos bem drenados (Hayward, 1991), sendo a severidade das perdas aumentada, quando plantas infectadas são expostas à seca (Hayward, 1994).

A murcha bacteriana ocorre em uma grande diversidade de solos, sendo alguns condutivos e outros supressivos à doença (Hayward, 1991;

Jaunet & Wang, 1997; Lopes, 1994a). Solos onde plantas de tomate crescem melhor têm pH entre 6,5 a 6,8, que é também favorável ao desenvolvimento do patógeno. A distribuição de *R. solanacearum* foi observada em solos infestados naturalmente, nas camadas de 0 a 90 cm de profundidade (Kelman et al., 1994). A persistência da bactéria em camadas profundas do solo pode explicar falha na desinfestação de solos e no controle de murcha bacteriana.

Na interação patógeno-hospedeiro, o principal fator ambiental que interfere é a temperatura. Alta temperatura é requisito para favorecer o desenvolvimento da doença sob condições de campo, bem como a sobrevivência deste patógeno no solo. A temperatura ótima está entre 25 e 35°C, mas em alguns casos, pode ocorrer murcha em batata em regiões temperadas (Kelman et al., 1994; Takatsu & Lopes, 1997).

Acredita-se que a fonte primária de inóculo do patógeno seja o próprio solo (French, 1994). A disseminação do patógeno a longa distância ocorre, principalmente, através de material vegetal infectado, tais como tubérculos de batata, rizomas e mudas (Hayward, 1991). O uso de ferramentas contaminadas em práticas culturais e o movimento de solo ou água de irrigação contaminados podem ser importantes fatores na disseminação da bactéria e introdução da doença em novas áreas (Hayward, 1994; Lopes & Reifschneider, 1999). Restos culturais infectados, parcialmente decompostos, e tubérculos assintomáticos deixados no campo podem ser importantes fontes de inóculo para culturas subseqüentes. A rápida multiplicação da bactéria em condições propícias aumenta a quantidade de inóculo liberado pelas raízes de plantas doentes e a infecção de plantas vizinhas. A exsudação da bactéria em plantas de fumo pode ser distribuída em plantas saudias próximas à planta doente, sob condições de chuva e vento (Hayward, 1991; Melton & Powell, 1991)

R. solanacearum invade o hospedeiro através de injúrias das raízes ou em pontos de emergência de pêlos radiculares e raízes laterais, existindo também evidências da sua habilidade de penetrar nas folhas via estômatos (Hayward, 1991; Kelman et al., 1994). As injúrias das raízes dos hospedeiros podem ser causadas por nematóides, implementos agrícolas utilizados nas práticas culturais ou no transplântio das mudas, facilitando a entrada da bactéria nas plantas.

McLaughlin et al. (1990) observaram a interação sinérgica entre o nematóide das galhas (*Meloidogyne* sp.) e *R. solanacearum* em vários hospedeiros. O aumento da incidência da murcha foi correlacionado à infecção pelo nematóide, que, além de causar ferimentos nas raízes, pode também modificar os tecidos da planta, propiciando aumento da colonização pela bactéria (Hayward, 1991).

Embora a murcha bacteriana seja importante no mundo inteiro, a ecologia da bactéria, em solos naturalmente infestados, é pouco compreendida (Lopes, 1994b). Estudos feitos em épocas de surto da doença mostraram haver aumento da população no solo, durante o aparecimento de sintomas de murcha em plantas de tomate (Ramesh & Bandyopadhyay, 1992).

Viana (1995) constatou que várias plantas consideradas como não suscetíveis e que são cultivadas tradicionalmente nos núcleos rurais do Distrito Federal, como beterraba, cenoura, coentro, feijão, caupi, pepino, quiabo, repolho e salsa, podem manter uma população elevada de um isolado da biovar I de *R. solanacearum* altamente virulento à batata e ao tomateiro. Verificou ainda que após o cultivo destas plantas por três meses em solo previamente infestado, os índices de murcha dos tomateiros plantados como iscas foram muito mais elevados do que os de parcelas cultivadas previamente com plantas suscetíveis. Estes resultados mostram que a permanência deste patógeno nos campos de

cultivo infestados ocorre em função da existência de plantas capazes de mantê-lo em elevadas populações no sistema radicular por períodos prolongados. Plantas suscetíveis que são infectadas apresentam sintomas da doença e morrem rapidamente, desfavorecendo a permanência de altas populações deste patógeno no solo.

Melo et al. (1999a), estudando o comportamento de espécies de plantas cultivadas como hospedeiras de *R. solanacearum* pertencentes às biovars 1, 2 e 3, verificaram que muitas espécies de plantas utilizadas em rotação de culturas visando o controle de murcha bacteriana podem ser hospedeiras não suscetíveis, podendo abrigar várias estirpes de *R. solanacearum* no sistema radicular.

Bringel et al. (2001a) avaliaram a população de *R. solanacearum* biovars 1, 2 e 3 em raízes de plantas cultivadas em casa de vegetação utilizando separadamente variantes de seis isolados resistentes a antibióticos. Observou-se que a ervilha mostrou ser boa hospedeira de todos os isolados, embora apenas um isolado da biovar 3 apresentou-se patogênico a esta espécie. A soja foi uma boa hospedeira de quatro isolados distribuídos entre as três biovars e o pepino bom hospedeiro de apenas dois isolados, das biovars 1 e 3. Para todos estes casos, exceto para o isolado que foi patogênico à ervilha, estas plantas comportaram-se como boas hospedeiras não suscetíveis. Verificaram também que alface e cebolinha não foram hospedeiras de nenhum dos isolados inoculados, indicando ser altamente promissoras para serem utilizadas em programas de rotação de cultura para o controle da murcha bacteriana. O arroz hospedou populações significativamente baixas de todos os isolados.

Segundo Takatsu & Lopes (1997) e Lopes & Reifschneider (1999), o estabelecimento de medidas de controle da murcha bacteriana é difícil devido à complexidade de sobrevivência no solo e ao largo círculo de

hospedeiras da bactéria, principalmente quando as condições ambientais são favoráveis à doença. As medidas a serem adotadas no controle da doença dependem da cultura, das estirpes do patógeno presentes, do conhecimento do seu sítio de sobrevivência e dos modos de transmissão (Hayward, 1994). Dentre estas medidas, se incluem o uso de cultivares resistentes, a rotação de culturas, a seleção de material de plantio livre do patógeno e o uso de microrganismos antagonistas (Michel et al., 1996).

O controle químico da murcha bacteriana tem apresentado pouco sucesso (Lopes, 1994a; Takatsu & Lopes, 1997). O uso de produtos químicos e antibióticos no controle da murcha bacteriana é impraticável (Eden-Green, 1994).

O meio mais efetivo de controle da murcha bacteriana têm sido realizado através de melhoramento visando resistência genética à doença (Lopes & Quezado-Soares, 1994). No entanto, esta modalidade de controle tem sido dificultada em condições de temperatura elevada. O exato padrão genético de resistência para as várias estirpes do patógeno não foi ainda definido para qualquer dos principais hospedeiros (Takatsu & Lopes, 1997).

Algumas fontes de resistência à murcha bacteriana tem sido relatadas em várias espécies hospedeiras, tais como: berinjela (Morgado, 1991); batata (Lopes & Quezado-Soares, 1994) e tomate (Ramesh & Bandyopadhyay, 1992), apesar de variedades desenvolvidas com alto nível de resistência em determinado local possam não sobreviver em outras condições ambientais ou a outras estirpes do patógeno (Kelman et al., 1994; Lopes, 1994b).

Plantas jovens de tomate e outras hospedeiras são mais suscetíveis do que as mais velhas, mas infecção natural no campo é normalmente observada no estágio de florescimento, não sendo a

resistência necessariamente comparável entre plântulas e plantas adultas (Hayward, 1991).

Segundo Agrios (1997), os mecanismos pelos quais microrganismos antagonistas afetam a população de patógenos não são sempre claros, mas são geralmente atribuídos a parasitismo direto, competição por nutrientes e nichos ecológicos e produção de substâncias antibióticas. Os agentes usados para controle biológico da murcha bacteriana incluem rizobactérias antagônicas, tendo sido obtida redução da doença com *Pseudomonas fluorescens* BC8, *Pseudomonas glumae*, *Pseudomonas fluorescens* e *Bacillus* sp. (Anuratha & Gnanamanickam, 1990; Furuya et al., 1991; Agrios, 1997). Há indicações de que o uso de mutantes avirulentos de *R. solanacearum* é mais promissor, entretanto, nenhum dos meios de controle biológico da murcha bacteriana alcançou o ponto de aplicação comercial (Hayward, 1991).

Umidade do solo e altas temperaturas são condutivos à murcha bacteriana. Assim, perdas foram minimizadas, manipulando a época de plantio e selecionando as áreas a serem cultivadas com batata (Lopes, 1994a).

Medidas de controle preventivas como o uso de material isento do patógeno são seguramente uma forma de controle da murcha bacteriana (Takatsu & Lopes, 1997). A utilização de água não contaminada na irrigação também previne a disseminação do patógeno (Lopes & Reifschneider, 1999). A eliminação de plantas invasoras suscetíveis assegura a baixa incidência da doença (Miranda, 1997).

O cultivo intercalado com culturas tem sido usado para redução da população do patógeno. Embora a bactéria sobreviva no solo por vários anos, sua população pode ser reduzida através de rotação com algumas culturas. Redução da população do patógeno no solo foi obtida

após o cultivo de arroz, milho, cana-de-açúcar e grama por período igual ou superior a dois anos (Bringel, 1997; Tussime et al. 1997)

Segundo Hayward (1994), a raça 3 (biovar 2) pode ser controlada pelo uso de variedades resistentes, por erradicação durante o pousio ou rotação de culturas e uso de sementes sadias. Entretanto, para a raça 1 (biovars 1, 3 e 4), que predomina em diferentes hospedeiros, o controle integrado, combinando resistência e práticas culturais adequadas, seria o mais apropriado.

2.2 O patógeno

2.2.1 Classificação de *Ralstonia solanacearum*

O agente causal da murcha bacteriana foi descrito pela primeira vez por Smith, em 1896, como *Bacillus solanacearum* e, desde então, vem recebendo diferentes denominações. A nomenclatura dada em 1914 pelo próprio Smith, de *Pseudomonas solanacearum*, prevaleceu por quase 80 anos. De acordo com análises de seqüência do fragmento 16S do RNA ribossomal, tem sido determinado que, ao nível mais alto *R. solanacearum* é membro da beta-subdivisão da classe Proteobactéria (Hayward, 1991). As técnicas modernas da biologia molecular têm facilitado a construção de árvores filogenéticas ou dendrogramas descrevendo as relações evolutivas em diferentes níveis de aprofundamento, com a conseqüente mudança do gênero. Em 1992, a bactéria foi reclassificada por Yabuuchi et al. (1992), dentro do grupo II de homologia de rRNA como *Burkholderia solanacearum* (Smith). Entretanto, menos de três anos depois, foi novamente reclassificada, com base nos dados de análise filogenética da seqüência de nucleotídeos do 16SrRNA, hibridação de rRNA-DNA, análise de lipídios celulares e de

ácidos graxos e nas características fenotípicas (Yabuuchi et al., 1995), dentro do mesmo grupo, porém como um novo gênero, *Ralstonia*, para abrigar o grupo de homologia de DNA distinto do grupo da espécie *Burkholderia cepacia*. Neste novo contexto, o gênero *Pseudomonas* passou a ser apenas das espécies fluorescentes (grupo I) e as fitopatogênicas não fluorescentes ficaram distribuídas entre os gêneros *Acidovorax* no grupo III e *Burkholderia* e *Ralstonia* no grupo II. O gênero *Ralstonia* ficou abrangendo as espécies *R. pickettii* e *R. solanacearum*. Esta nova classificação foi aceita e validada pela IJSB (Yabuuchi et al., 1992; Yabuuchi et al., 1995).

Em nível infra-subespecífico, *R. solanacearum* tem sido classificada de acordo com a hospedeira, distribuição geográfica, patogenicidade, relações epidemiológicas, propriedades fisiológicas e padrões de proteínas de membranas (Dristig & Dianese, 1990; Hayward, 1991; Hayward, 1964). Assim, através do tempo, foram relatadas 5 raças baseadas principalmente na gama de hospedeiras que afetam (Agrios, 1997; Hayward, 1964). A raça 1 (biovars 1, 3 e 4) ataca um grande número de plantas, incluindo batata, tomate, fumo e solanáceas em geral. A raça 2 (biovars 1, 3 e 4) ataca banana e similares. A raça 3 (biovar 2) é considerada específica de batata, mas está associada a algumas solanáceas. A raça 4 (biovar 4) ataca gengibre e a raça 5, amora (Hayward, 1991; Hayward, 1994).

Quando uma coleção de isolados de *R. solanacearum* foi examinada detalhadamente, entretanto, observou-se que os isolados da biovar II não eram tão homogêneos quanto se esperava (Hayward, 1994) e diferenças em relação ao fenótipo original foram detectadas em isolados de outros países da América do Sul. Assim, a nomenclatura para estes fenótipos foi sugerida por French et al. (1993) como: biovar II-A (de Andes), que agrupa os isolados especializados para atacar a batata

em climas frios; e biovar 2-T (de tropical), para isolados associados a regiões de baixa altitude.

2.2.2 Caracterização fenotípica (morfológicas, fisiológicas e quimiotaxonômicas)

Espécies do gênero *Ralstonia* apresentam bastonetes retos ou levemente curvos, nunca helicoidais, medindo 0,5 - 1,0 x 1,5 - 3,0 micrômetros, não esporogênicas, móveis por meio de um a vários flagelos polares, raramente não-móveis, aeróbias estritas, catalase-positiva, quimiorganotróficas (Agrios, 1997; Pelczar, 1996). Algumas espécies, inclusive *R. solanacearum*, acumulam reservas sob forma de grânulos de poli-B-hidroxitirato e possuem relação molar G + C% do DNA entre 58 e 70. O gênero engloba um grande número de espécies, tanto saprófitas como patogênicas ao homem, aos animais e às plantas. As espécies fitopatogênicas exibem uma enorme diversidade bioquímica e fisiológica, com algumas dessas produzindo pigmentos fluorescentes, visualizáveis sob luz ultravioleta (Hayward, 1991).

R. solanacearum é uma bactéria Gram negativa, aeróbica, móvel por um a quatro flagelos polares, em forma de bastonete com 0,5 - 0,7 x 1,5 - 2,5 micrômetros (Bringel, 1997) e faz parte do grupo das não fluorescentes que não crescem a 40 °C.

Kelman (1953) relatou que, quanto à morfologia, podem ser observados diferentes tipos de colônias: um normal, cujas colônias são lisas, fluidas, irregularmente arredondadas e opacas; um mutante de colônias redondas, translúcidas, rugosas e não fluidas. Observou ainda que em meio contendo tetrazólio, as colônias normais virulentas são lisas, fluidas, irregularmente arredondadas, brancas ou levemente avermelhadas no centro da colônia e as mutantes avirulentas,

completamente vermelhas. Diferenças entre tipos de colônias e níveis de virulência estão relacionadas à presença e à quantidade de um mucopolissacarídeo extracelular da bactéria. Este patógeno apresenta grande variação e a grande maioria dos isolados perde facilmente a patogenicidade quando mantida em meio de cultura, sendo este fenômeno correlacionado com a variação da colônia (Kelman, 1965).

Hayward (1964), considerando as características fisiológicas de *R. solanacearum*, classificou estirpes do patógeno em quatro biovars, baseado na utilização de três açúcares (lactose, maltose e celobiose) e em três álcoois (manitol, sorbitol e dulcitol), como única fonte de carbono e na formação de ácidos.

Muitos trabalhos têm mostrado que vários genes bacterianos de *R. solanacearum* estão envolvidos na interação entre bactérias e plantas hospedeiras. Dentre eles podem ser citados: *hrp* (hypersensitive reaction and pathogenicity), para iniciação de sintomas em plantas não hospedeiras e o desenvolvimento de reação de hipersensibilidade (HR) em plantas não hospedeiras; *dsp* (disease specific) compreendem genes que interferem com o desenvolvimento da doença em plantas hospedeiras, mas que não envolvem a indução de HR em espécies não hospedeiras; *avr* (avirulence reaction) correspondem a genes envolvidos no controle da interação específica cultivar-raça, restringindo a gama de hospedeiros (Feng et al., 1992). Vários genes foram identificados, cujos produtos ou ação são requeridos para o desenvolvimento normal da doença, sendo o polissacarídeo extracelular (EPS) o principal fator de virulência, enquanto que enzimas como a endoglucanase extracelular (Egase), a endopoligalacturonase (Pgase) e a pectina metil esterase (PMEase) são consideradas fatores de virulência secundários, pois atuam nas paredes das células da planta, contribuindo para o surgimento mais rápido do sintoma de murcha da planta hospedeira. Na

sua ausência, as plantas infectadas levam mais tempo para morrer (Coplin & Cook, 1990; Allen et al., 1992; Denny et al., 1994; Huang et al., 1993).

Estudos incluindo o círculo de hospedeira do patógeno, morfologia da colônia, análise bioquímica, fisiológica e de sua biologia molecular (Kelman, 1953; Hayward, 1991; Morgado et al., 1992; Melo et al., 1999a; Melo et al., 1999b; Melo et al., 1999c, Martins, 2000) sugerem que esta bactéria é uma espécie complexa e heterogênea, e que compreende populações diversas. Apesar deste tipo de análise ser útil como meio de catalogar a diversidade das estirpes, fornece pouca base para a compreensão da origem e do significado desta diversidade (Cook & Sequeira, 1994). Além dessas, outras evidências demonstram a heterogeneidade deste organismo em nível subespecífico, como a diferença na versatilidade nutricional entre os biovars 1, 2 e 3, 4, formação de grupos distintos através de taxonomia numérica (Engelbrecht, 1989), produção de diferentes padrões eletroforéticos de proteínas da membrana (Dristig et. al, 1990) e diferenciação dos biovars 1 e 2 de 3 e 4 através de sondas de DNA e análise RFLP (Cook et al., 1989).

Esta variabilidade tem dificultado o controle deste patógeno, além disso, esta heterogeneidade caracteriza um grande obstáculo à produção de variedades resistentes, já que a resistência incorporada a um determinado isolado não confere necessariamente resistência aos demais (Gillings & Fahy, 1993).

2.2.3 Caracterização genotípica

Através de métodos moleculares, avanços foram conseguidos na identificação e caracterização de *R. solanacearum* nos últimos anos (Seal

& Elphinstone, 1994; Cook & Sequeira, 1994; Gillings & Fahy, 1994). Com isso foi possível obter uma visualização evolutiva bastante significativa deste patógeno, trazendo grandes esperanças na identificação das estirpes no contexto epidemiológico, que tornem viáveis a orientação das estratégias de controle e os trabalhos de melhoramento genético para a obtenção de cultivares resistentes à murcha bacteriana.

Métodos baseados na análise direta do genoma, como “fingerprint” de DNA, Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), análise de seqüências repetitivas do genoma e análise da região espaçadora entre os genes ribossomais (16S e 23S) através de Polymerase Chain Reaction (PCR), Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE), oferecem a possibilidade de se detectar mínimas variações genéticas, permitindo a identificação de linhas clonais dentro das espécies (Seal et al., 1992; Giselle & Lindstrom, 1994; Louws et al., 1994; Gillings & Fahy, 1994; Smith et al., 1995; Martins, 2000).

Cook & Sequeira (1994) identificaram 33 grupos de RFLP, utilizando sondas que especificam a virulência ou relação de hipersensibilidade, baseados na gama de hospedeiros e em características fisiológicas. No entanto, a origem geográfica das estirpes é a característica mais correlacionada com as análises de RFLP, podendo ser visualizadas duas divisões geneticamente distintas, uma da Austrália (biovars 3, 4 e 5), e outra das Américas (1, 2 e 2T). Um dos mais interessantes aspectos de RFLP e seus clones está relacionado com a biovar 2 isolada de batata. Foram identificados dentro desta biovar apenas 2 grupos (26 e 27), ambos geneticamente muito próximos. Destes, o grupo encontrado em muitas áreas de produção de batata, em diferentes países, foi o 26, originário da região oriental dos Andes, de onde os primeiros colonizadores espanhóis levaram a batata para outras partes do mundo. Os grupos identificados dentro da biovar N₂ ou 2-T

(fenótipo tropical de baixa altitude, Hayward, 1991) foram os de números 29, 30 e 32, geneticamente muito mais variáveis e diferentes dos grupos 26 e 27, e, muito provavelmente, originários de diferentes espécies hospedeiras naturais que não a batata (Takatsu & Lopes, 1997).

Entre 23 isolados brasileiros da biovar 2, examinados por French et al. (1993), 14 (9 de Brasília, 1 de Minas Gerais e 4 do Estado de São Paulo) 14 eram da biovar 2-T. A ocorrência da biovar 2 nas culturas instaladas em terras recém-desmatadas tem sido registrada em toda a região Centro-Sul do Brasil, sendo provável que a diversidade da biovar 2-T seja muito maior, com muitas hospedeiras nativas.

Dentre as várias subdivisões encontradas dentro de *R. solanacearum*, a raça 3 apresentou o menor nível de heterogeneidade. Estes resultados são consistentes com a classificação dos isolados em raças e biovars, pois a raça 3, sinônimo de biovar 2, apresentou o menor círculo de hospedeiras, sendo basicamente limitada à batata. A análise RFLP de isolados biovar 2 (Cook et al., 1989) demonstrou que os mesmos eram extremamente conservados ao nível de DNA. Entretanto, alguns isolados encontrados em terras baixas da Amazônia (N₂) apresentaram-se metabolicamente mais versáteis do que os isolados biovar 2 encontrados nas terras altas dos Andes (Martin et al., 1992; Hayward et al., 1994). Gillings & Fahy (1993) examinaram 53 isolados de *R. solanacearum* pertencentes aos biovars 2 e N₂ através da análise da digestão total do DNA genômico, identificando 5 grupos RFLP compatíveis com aqueles identificados por Cook et al. (1989). Dentro de alguns destes grupos foram encontradas subdivisões, totalizando 11 linhas clonais, como já havia sido descrito para outras populações de bactérias fitopatogênicas (Cook, 1994).

A reação da polimerase em cadeia (PCR) é atualmente uma técnica com inúmeras aplicações em ciências biológicas, tanto em pesquisa básica como aplicada. PCR é uma técnica fácil, rápida, versátil e sensível, que envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase (Mullis, 1990). A reação de PCR é baseada no anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos (pequenas moléculas de DNA de fita simples) utilizados como iniciadores (“primers”) que delimitam a seqüência de DNA de fita dupla alvo da amplificação (Ferreira & Grattapaglia, 1998). PCR é iniciada pela separação das fitas do DNA-molde, através da elevação da temperatura da reação (desnaturação). A temperatura então é diminuída, para que haja anelamento dos indicadores com o DNA-molde, e a polimerase possa atuar, estendendo um novo fragmento. O fragmento produzido na reação anterior serve também como molde para a reação seguinte. PCR envolve, portanto, ciclos repetidos de desnaturação do DNA, anelamento dos iniciadores com suas seqüências complementares e polimerização da fita complementar ao molde (Gama, 1998). Usando PCR, famílias de seqüências repetitivas de DNA presentes no genoma de bactérias têm sido utilizadas na caracterização e subdivisão de espécies bacterianas ao nível intraespecífico (Louws et al., 1995). Três famílias têm sido estudadas mais detalhadamente: seqüências de 35 - 40 pb, denominadas “palindrômicas repetitivas extragênicas” (REP), que possuem um número de cópias variando entre 500 a 1000 em *E. coli* (Gilson et al., 1984); famílias de 124 - 127 pb denominadas “consensuais intergênicas repetitivas enterobacterianas” (ERIC) com número de cópias de 30 - 50 em *E. coli* e famílias de 154 pb denominadas “BOX” que possuem número de cópias semelhantes às seqüências ERIC (Martin et al., 1992). Os elementos BOX parecem estar

envolvidos na ligação da DNA girase e terminação da transcrição durante a replicação (Versalovic et al., 1991). As seqüências REP foram descritas inicialmente como seqüências com potencial regulatório dentro de regiões de operons não codificadoras em virtude da sua natureza palindrômica e devido a sua habilidade de formar estruturas estáveis de “stem-loop” no RNA transcrito (Versalovic et al., 1991). Os elementos ERIC maiores que 126 pb contêm seqüência central repetitiva, invertida e altamente conservada, localizada na região intergênica (Hulton et al., 1991). Dois mecanismos podem contribuir para o alto grau de conservação evolucionária destes elementos repetitivos: 1. a seleção natural a qual pode restringir a variação dessas seqüências por representarem locais de interação entre proteínas essenciais e o DNA; 2. autopropagação de seqüência por conversão gênica como um DNA “egoísta” (Gilson et al., 1990).

Essas seqüências repetitivas podem ser um indicativo da estrutura e evolução do genoma bacteriano e sua amplificação por meio da reação de polimerização (PCR) permite uma rápida avaliação da variabilidade genética de uma população representativa do patógeno (Louws et al., 1994). Essa informação, por sua vez, pode ser associada à distribuição microgeográfica do patógeno no campo e auxiliar na formação de hipóteses a respeito da epidemiologia da doença (Vera Cruz et al., 1996).

A utilização de rep-PCR para caracterização de bactérias e estudos de diversidade genética tem se mostrado como uma ferramenta útil para muitas bactérias como, por exemplo, *Rhizobium* e outros habitantes do solo (de Bruijn, 1992), espécies de *Xanthomonas* e *Pseudomonas* (Louws et al., 1994), *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Vera Cruz et al., 1996), *Clavibacter michiganensis* (Louws et al., 1998), espécies de *Bartonella*, *Legionella*, Cyanobactérias (Rasmussen et al., 1998), *Xylella fastidiosa*

(Lemos et al., 1999; Travensolo, 2000; Wendland, 2000), *Staphylococcus aureus* e *Ralstonia solanacearum* (Wulling et al., 1998; Martins, 2000). Todos estes estudos foram baseados na distribuição de seqüências ERIC, BOX e REP encontradas em eubactérias, primariamente do grupo das gram-negativas. Essas seqüências geram perfis de PCR distintos e reproduzíveis que podem ser utilizados para análises de grandes populações em diferentes níveis taxonômicos e para obtenção de indicadores específicos. Entretanto, devido à presença comum destas seqüências em várias espécies de bactérias, a utilização destes iniciadores requer culturas axênicas (Louws et al., 1995; Louws et al., 1999).

Segundo Gillings & Fahy (1993), os avanços na tecnologia do DNA possibilitaram identificar isolados de *R. solanacearum* para definir esquemas taxonômicos que caracterizem as relações filogenéticas e para conduzir investigações epidemiológicas baseadas em manipulações de DNA. Os “fingerprints” genômicos gerados mostraram que os isolados identificados como N₂ apresentavam baixa similaridade entre si e com isolados do biovar 2 (Gillings & Fahy, 1993). Esta variabilidade reflete diferenças fenotípicas entre os biovares e N₂, tais como diferença de patogenicidade em espécies de *Solanum* e atividade metabólica (Hayward et al., 1991).

Smith et al. (1995) demonstraram ocorrência de diversidade entre isolados de *R. solanacearum* raça 3, biovar II, originários do Quênia, até então desconhecida, através do uso de “Pulsed-Field Gel Electrophoresis” e de “primers” correspondentes a seqüências repetitivas amplificadas através de PCR (ERIC e BOX). Ainda, o trabalho identificou tendências biogeográficas de disseminação do patógeno e revelou níveis de diversidade genética dentro do grupo, além de, identificar mais de 10 padrões eletroforéticos distintos, com importantes

correlações geográficas. Gillings & Fahy (1994) utilizaram as técnicas de rep-PCR que permitiram a identificação de subgrupos ou clones dentro dos genótipos multiloculados.

Poucos estudos têm sido realizados objetivando analisar a diversidade genética dentro das subdivisões da espécie *R. solanacearum* (Smith et al., 1995; Yang & Ho, 1998) e poucos isolados brasileiros, em geral pertencentes apenas à região Amazônica (biovar 1 e 3), têm sido incluídos. No caso específico de *R. solanacearum*, a utilização de marcadores tem contribuído amplamente para o estudo da evolução e variabilidade intraespecífica existentes. A caracterização de populações bacterianas ocorrentes em diferentes regiões geográficas é extremamente importante para o estudo da epidemiologia de um patógeno e desenvolvimento de estratégia para seu controle. Até o presente momento, poucos estudos, ao nível molecular, têm sido desenvolvidos objetivando a caracterização de *R. solanacearum* biovar 2 ocorrente no Brasil.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados no Centro Nacional de Pesquisa em Hortaliças (Embrapa-Hortaliças) em Brasília-DF, no Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia (Embrapa-Cenargen) em Brasília - DF e no setor de Fitopatologia do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola – ESALQ/USP em Piracicaba - SP

3.1 Obtenção de isolados de *Ralstonia solanacearum*

Foram utilizadas culturas preservadas da coleção de bactérias fitopatogênicas do Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças da Embrapa. No total, foram utilizados 51 isolados de *R. solanacearum* pertencentes à biovar 2, provenientes de diferentes regiões geográficas, sendo 9 obtidos de berinjela e 42 de batata (Tabela 1).

As bactérias foram transferidas inicialmente para meio de cultura MB-1 e 523 de Kado & Heskett (1970). O meio MB-1 foi constituído por sacarose (10 g), caseína hidrolizada (2 g), extrato de levedura (4 g), peptona (1 g), K₂HPO₄ (2 g), MgSO₄.7H₂O (0,3 g), ágar (20 g), água para completar 1 litro e pH ajustado para 6,8-7,0. O meio 523 de Kado & Heskett (1970) foi preparado a partir dos componentes sacarose (5 g), dextrose (5 g), peptona (4 g), extrato de levedura (4 g), caseína hidrolizada (4 g), K₂HPO₄ (2-4 g), MgSO₄.7H₂O (0,3 g), ágar (20 g), água para completar 1 litro e pH ajustado para 6,8-7,0. Em seguida, a seleção

dos isolados foi feita com base nas características morfológicas, selecionando-se as colônias brancas e fluidas que se desenvolveram em meio de cultura seletivo de Kelman (1953) cuja composição apresentava: glicerol (5,0 mL), peptona (10,0 g), caseína (1,0 g), ágar (18 g), cloreto de tretazólio (1%) 5,0 mL, água para completar 1 litro e pH ajustado para 6,8-7,0. Os isolados foram identificados de acordo com a classificação de Hayward (1964) e, posteriormente preservados em água destilada esterilizada (Wakimoto et al., 1982) até a sua utilização.

Tabela 1. Isolados de *Ralstonia solanacearum* biovar 2, hospedeiro de origem e local de procedência.

Isolado *CNPH n°	Hospedeiro	Procedência
71	Berinjela	Alexandre Gusmão-DF
77	Berinjela	Alexandre Gusmão-DF
79	Berinjela	Alexandre Gusmão-DF
81	Berinjela	Alexandre Gusmão-DF
82	Berinjela	Alexandre Gusmão-DF
83	Berinjela	Alexandre Gusmão-DF
84	Berinjela	Alexandre Gusmão-DF
87	Berinjela	Alexandre Gusmão-DF
89	Berinjela	Alexandre Gusmão-DF
2	Batata	UnB-DF
44	Batata	Brasília-DF
57	Batata	Vargem Bonita-DF
65	Batata	Ibicoara-BA
66	Batata	Ibicoara-BA
67	Batata	Ibicoara-BA
68	Batata	Ibicoara-BA
69	Batata	Ibicoara-BA
70	Batata	Ibicoara-BA

Tabela 1. Isolados de *Ralstonia solanacearum* biovar 2, hospedeiro de origem e local de procedência.

Isolado *CNPH nº	Hospedeiro	Procedência
90	Batata	Brasília-DF
91	Batata	Brasília-DF
92	Batata	Brasília-DF
94	Batata	Piraí do Sul-PR
95	Batata	Piraí do Sul-PR
96	Batata	Piraí do Sul-PR
97	Batata	Piraí do Sul-PR
98	Batata	Piraí do Sul-PR
99	Batata	Piraí do Sul-PR
107	Batata	Araucária-PR
111	Batata	Cotenda-PR
113	Batata	Mariental-PR
115	Batata	Lapa-PR
120	Batata	Lapa-PR
130	Batata	Araucária-PR
131	Batata	Araucária-PR
132	Batata	Araucária-PR
133	Batata	Araucária-PR
134	Batata	Contenda-PR
135	Batata	Contenda-PR
137	Batata	Contenda-PR
138	Batata	Lapa-PR
139	Batata	Lapa-PR
140	Batata	Lapa-PR
141	Batata	Lapa-PR
153	Batata	Guarapuava-PR
154	Batata	Guarapuava-PR
156	Batata	Cristalina-GO
157	Batata	Cristalina-GO
162	Batata	André da Rocha-RS
164	Batata	Novo Prata -RS
165	Batata	Novo Prata -RS
173	Batata	Brasília-DF

*CNPB - Centro Nacional de Pesquisa em Hortaliças - EMBRAPA - DF

3.2 Padronização de idade dos isolados de *Ralstonia solanacearum* biovar 2

Os isolados selecionados haviam sido obtidos de amostras coletadas em diferentes épocas, havendo, portanto, a necessidade de se realizar uma padronização destes isolados, quanto à idade dos mesmos.

Para isso, os isolados de batata e berinjela (Tabela 1) foram inoculados em batata (cultivar Monalisa) e, posteriormente, reisolados, permitindo assim obter-se isolados de virulência comprovada em uma mesma época. Esta etapa foi realizada em casa de vegetação com condições de temperatura de 18 - 20°C (mínima noturna e máxima diurna, respectivamente), sendo as plântulas crescidas em caixas sementeiras com areia peneirada e autoclavada.

O método de inoculação utilizado foi o de imersão das raízes das plântulas na suspensão bacteriana (10^8 ufc/mL) antes de transplantar para vasos com capacidade de 1,5 L contendo solo (Lopes, 1981). As plantas foram inoculadas, aproximadamente, aos 15 dias após a semeadura.

O isolamento foi feito seis dias após a inoculação, utilizando-se parte do tecido vegetal infectado. Estes tecidos foram colocados em tubos de ensaio e, em seguida observado o fluxo bacteriano, o qual foi transferido para meio de cultura 523. Os isolados foram mantidos em água esterilizada e meio de cultura 523 para os ensaios subsequentes.

3. 3 Caracterização dos isolados de *Ralstonia solanacearum*

3.3.1 Morfológica

3.3.1.1 Avaliação dos aspectos culturais de *Ralstonia solanacearum* biovar 2 em meio de cultura.

As características dos 51 isolados selecionados foram observadas quanto ao tamanho das colônias, coloração, presença/ausência de mutantes, número de colônias e presença/ausência de melanina.

As bactérias foram repicadas para meio de cultura 523. A concentração da suspensão bacteriana foi determinada através de leitura em espectrofotômetro (550 nm), de acordo com uma equação previamente estabelecida. Foi utilizada, para o plaqueamento, uma suspensão bacteriana com concentração de 10^8 ufc/mL. Foi colocado em cada placa 0,005 mL da suspensão bacteriana para cada isolado, sendo utilizadas 4 placas por isolado. Após 48 horas em estufa a 28 °C, foram feitas as avaliações utilizando-se contador de colônias e microscópio estereoscópio binocular.

Quanto ao tamanho, foi utilizada uma escala com três níveis: colônias pequenas com diâmetro menor ou aproximadamente 0,4 mm; colônias médias com diâmetro compreendido entre 0,4 - 0,8 mm e grandes com diâmetro variável de 0,8 a 1,5 mm.

A presença de melanina foi observada pela ausência ou presença em meio de cultura, sendo caracterizada a presença por uma alteração na coloração no meio de cultura.

A ocorrência ou não de mutantes foi observada tomando-se por base as colônias normais, que são caracteristicamente brancas, fluidas e arredondadas.

3.3.2 Bioquímica

3.3.2.1 Teste de oxidação-fermentação (OF ou teste de crescimento anaeróbico)

O ensaio teve como finalidade distinguir bactérias do gênero *Erwinia*, que são anaeróbicas facultativas, de outras bactérias Gram-negativas aeróbicas, especialmente *Xanthomonas* e *Ralstonia* (Black et al., 1996; Mariano, 2000). Foram utilizados 51 isolados de *R. solanacearum* biovar 2 (Tabela 1).

A partir de colônias com 48 horas de crescimento foi preparada a suspensão bacteriana em água. Um volume de aproximadamente 0,005 ml da suspensão de 10^8 ufc/mL de cada isolado foi depositado, com a alça de níquel cromo nº 22 de 3 mm de diâmetro, no meio de cultura, sob condições assépticas, em tubos contendo 5 mL do meio, e, em seguida, a cada tubo foi adicionado óleo mineral (5 a 10 mm acima do nível do meio). O meio de cultura utilizado apresentou a seguinte composição: água destilada 100 mL, dextrose 1g, extrato de levedura 100 mg, peptona 200 mg, azul de bromotimol a 1 % e pH ajustado para 7,0. Foram utilizados 4 tubos por isolado. A incubação foi feita em estufa por 24 horas a 28 - 32 °C.

As avaliações foram realizadas através da observação de mudança na coloração no meio de cultura, de verde-azulada para amarelada, indicando o crescimento de bactérias aeróbicas facultativas.

3.3.2.2 Utilização de asparagina como fonte única de carbono e nitrogênio

O objetivo foi distinguir bactérias do gênero *Ralstonia* de bactérias do gênero *Xanthomonas*. *Ralstonia* cresce em meio de clara, utilizando a asparagina como fonte única de carbono e nitrogênio, enquanto *Xanthomonas* não cresce neste meio (Black et al., 1996; Mariano, 2000).

Foram utilizados 51 isolados de *R. solanacearum* biovar 2 (Tabela 1). A partir de colônias com 48 horas de crescimento foi preparada a suspensão bacteriana em água. Um volume de aproximadamente 0,005 ml da suspensão bacteriana de 10^8 ufc/mL de cada isolado foi colocado, separadamente, em placas contendo o meio, sendo utilizadas 4 placas por isolado. A incubação foi conduzida em estufa a 28 - 32 °C e as avaliações foram feitas 4 dias após a repicagem, através da observação do aparecimento de colônias sobre o meio. O meio de cultura utilizado apresentou a seguinte composição: água destilada 100 mL, asparagina 1g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 50 mg, K_2HPO_4 50mg, ágar 1,5 g e pH ajustado para 7,0

3.3.2.3 Produção de pigmentação fluorescente em meio King

O ensaio teve como objetivo distinguir bactérias fluorescentes de não fluorescentes (Black et al., 1996; Mariano, 2000). Foram utilizados 51 isolados de *R. solanacearum* biovar 2 (Tabela 1).

A suspensão bacteriana foi obtida a partir de colônias com 48 horas de crescimento. Um volume de aproximadamente 0,005 ml da suspensão bacteriana de 10^8 ufc/mL de cada isolado foi depositado, com a alça de níquel cromo nº 22 de 3 mm de diâmetro, no meio de cultura, sob condições assépticas, em tubos contendo 10 mL do meio. Em

seguida, a incubação foi conduzida em estufa a 28 - 32 °C. O meio utilizado apresentou a seguinte composição: água destilada 1 L, proteose peptona 20 g, glicerina 15 mL, MgSO₄.7H₂O 1,5 g, K₂HPO₄ 1,5 g e pH ajustado para 6,8 - 7,0. Posteriormente, foram adicionados 18 g de ágar bacteriológico, sob aquecimento, até dissolução do ágar. Foram utilizados 4 tubos por isolado.

Foram feitas as avaliações 48 horas após a repicagem, observando-se o aparecimento de pigmento amarelo-esverdeado (pioverdina) que se difundia para o meio de cultura ao redor das colônias, caracterizando o resultado positivo (Black et al., 1996; Mariano, 2000).

3.3.2.4 PBHB (Coloração de grânulos de poli-b-Hidroxibutirato)

Este teste também foi conduzido com o objetivo de separar o grupo de bactérias fluorescentes daquele não fluorescente.

Os 51 isolados foram colocados para crescer em meio de cultura BDA, pobre em nitrogênio e rico em carbono, pH corrigido para 6,8 - 7,0. Após a repicagem, os isolados foram incubados em estufa a 28 - 32 °C, pelo período de 48 horas. Em seguida, para cada isolado, foi preparado um esfregaço em lâmina de microscopia e fixado com o corante Sudan blackB (água destilada 2,5 mL, álcool etílico 96 % 2,5 mL, Sudan black B 30 - 50 m). As lâminas foram incubadas por 15 minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com água, imersas rapidamente em xilol (3 vezes) e deixadas para secar. Posteriormente, o esfregaço foi coberto com o corante safranina (0,5 %) por 1 minuto, lavado com água e seco ao ar. As observações foram feitas com o auxílio de microscópio com a objetiva de imersão, observando-se a presença de inclusões citoplasmáticas de coloração azul-escuro, características das

bactérias que acumulam PBHB. Os resultados foram considerados negativos quando o citoplasma bacteriano se apresentou totalmente colorido de vermelho (Black et al., 1996; Mariano, 2000).

3.3.2.5 Classificação dos isolados em biovars

A identificação ao nível de biovar foi feita através dos testes de produção de ácidos a partir de açúcares (lactose, maltose, celobiose e trealose) e álcoois (manitol, sorbitol e dulcitol), segundo a metodologia de Hayward (Tabela 2). Cada isolado foi cultivado em meio de cultura 523 e após 48 horas, um volume de aproximadamente 0,005 mL da suspensão bacteriana de 10^8 ufc/mL de cada isolado foi depositado, com a alça de níquel cromo nº 22 de 3 mm de diâmetro, no meio de cultura contendo açúcares e álcoois, sob condições assépticas. Depois de um período de 48 horas em estufa a 28 °C foram feitas as leituras. Reações positivas foram caracterizadas quando a coloração do meio era alterada de verde-azulada para amarela e negativas, quando a coloração original do meio não era alterada. O açúcar trealose foi posteriormente utilizado para permitir a diferenciação entre a biovar 2-A (não utiliza) e a biovar 2-T. Um isolado pertencentes à biovar 3 (UnB - 630), capaz de produzir ácido a partir dos três açúcares e álcoois, foi incluído no teste como testemunha.

acordo com uma equação previamente estabelecida. Foi utilizada para a inoculação a suspensão bacteriana com concentração de 10^8 ufc/mL.

As cultivares de berinjela usadas nas inoculações para avaliação da virulência dos isolados foram CNPH-175 e CNPH 110, padrões de resistência e suscetibilidade, respectivamente. As cultivares foram semeadas diretamente em vasos contendo de 0.5 litro de solo previamente autoclavado. Após a germinação das plantas foi feito um desbaste, mantendo-se uma planta por vaso e um padrão uniforme de plantas.

Para a batata, foram usadas as cultivares Achat e Monalisa, padrões de resistência e suscetibilidade, respectivamente. Brotos de batata foram colocados diretamente em bandejas contendo areia peneirada e autoclavada. Após o enraizamento, foi feito o transplante para vasos de 0,5 L, contendo solo previamente autoclavado. As plantas foram mantidas em casa de vegetação à temperatura de 18-20 °C (mínima noturna e máxima diurna).

As plantas foram inoculadas no estágio fenológico correspondente à presença de um par de folhas definitivas, totalmente expandidas, para ambas as espécies. O método de inoculação para berinjela consistiu em ferimento no caule das plantas causado pela introdução de um alfinete entomológico número 3 que transpassava uma gota de 10 microlitros da suspensão do inóculo, depositada na axila foliar (Morgado et al., 1994), conforme a Figura 1. O método de inoculação utilizado para batata consistiu no corte do sistema radicular com tesoura, e, em seguida, as raízes foram imersas em uma suspensão bacteriana de concentração 10^8 ufc/mL (Lopes, 1981), conforme a Figura 2.

As avaliações da agressividade foram feitas em função do número de plântulas murchas ou mortas. O experimento foi avaliado aos 5 e 10 dias após a inoculação, através de uma escala de notas variando de 1 a

5 (Nielson & Haynes, 1960), com a seguinte correspondência: 1 = ausência de sintomas; 2 = planta com 1/3 das folhas murchas; 3 = planta com 2/3 das folhas murchas; 4 = planta totalmente murcha; 5 = planta morta. Foram feitas leituras diárias do desenvolvimento da doença até o 10^o dia após a inoculação.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados com quatro repetições. A parcela experimental foi constituída de seis vasos, com uma planta por vaso. Utilizou-se o programa estatístico SAS para efetuar as análises dos dados.

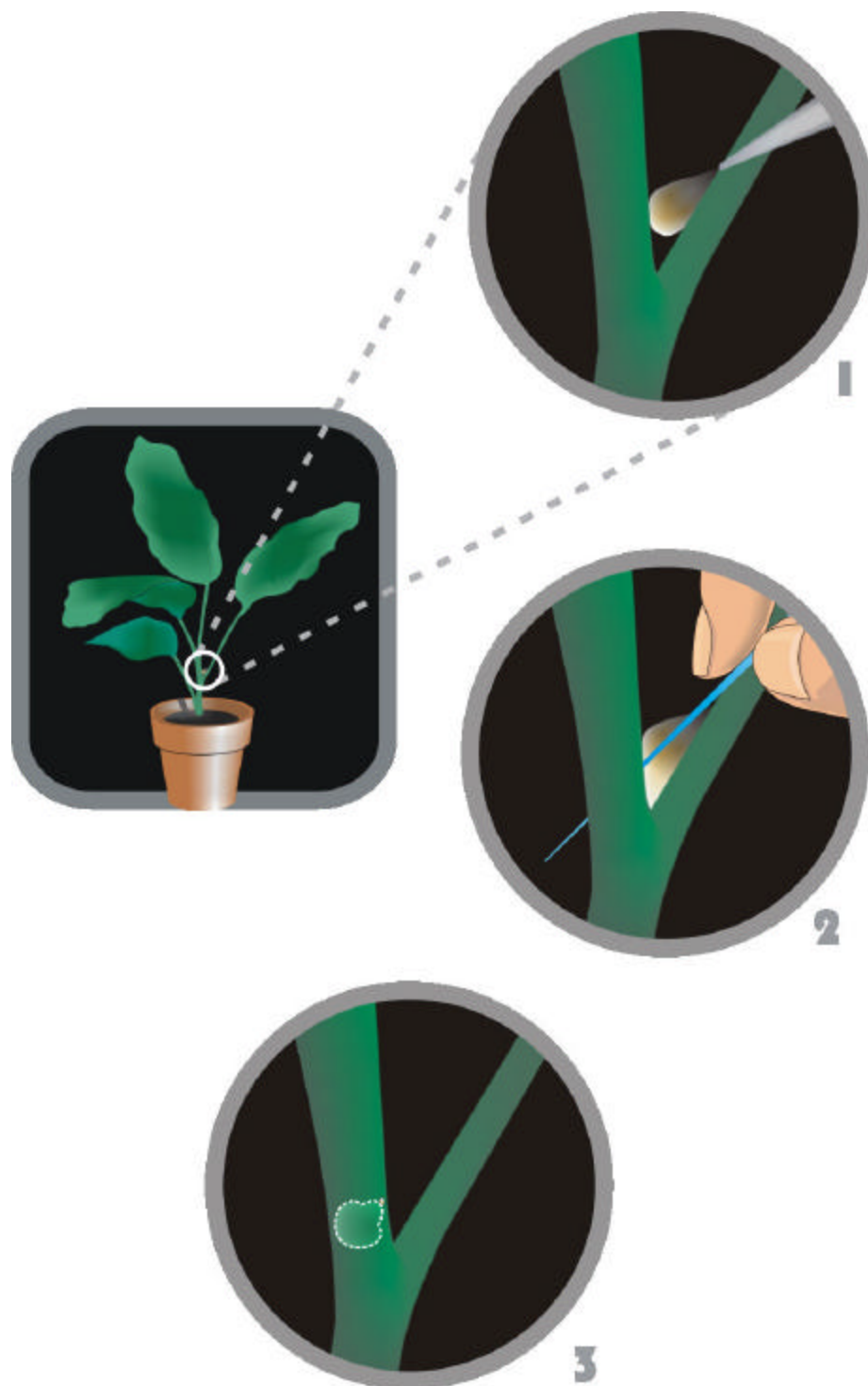


Figura 1 - Esquema de inoculação de *Ralstonia solanacearum* em berinjela (Morgado et al., 1994).

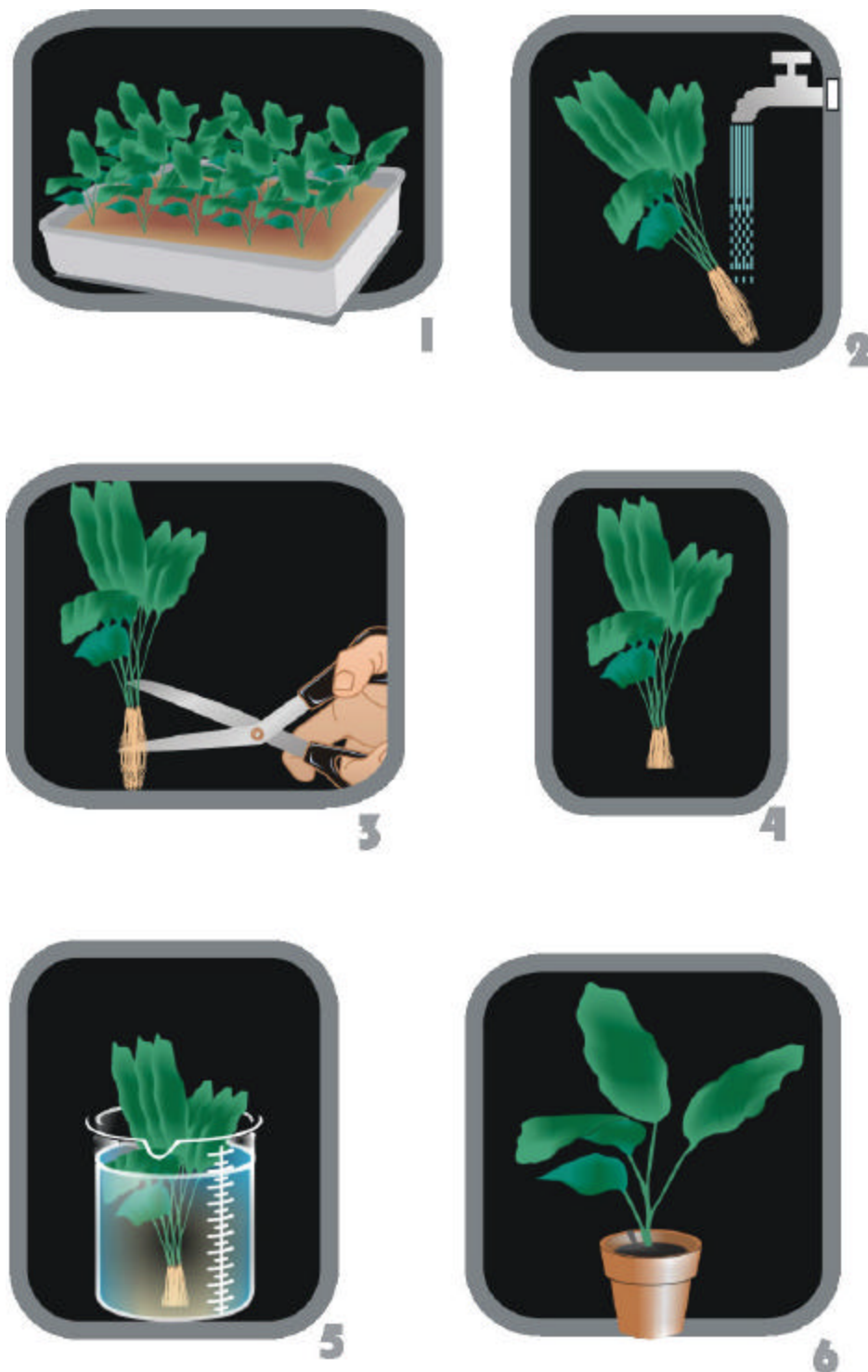


Figura 2 - Esquema de inoculação de *Ralstonia solanacearum* em batata (Lopes, 1981).

3.3.3.2 Avaliação do desenvolvimento de isolados de *Ralstonia solanacearum* biovar 2 na rizosfera de plantas de batata e berinjela, *in vitro*.

O objetivo do presente ensaio foi verificar o desenvolvimento de cada um dos 51 isolados, individualmente, na rizosfera de plantas de batata (cultivares Achat e Monalisa) e berinjela (cultivares CNPH-110 e CNPH-175). As vantagens deste método se referem à possibilidade de se visualizar e avaliar diretamente a colonização de raízes pela bactéria inoculada, a de poder trabalhar com grande número de plantas em pequeno espaço físico, além de se poder obter resultados em curto espaço de tempo.

O meio de cultura utilizado foi o de Murashige & Skoog (1962), na concentração de 50% de macro e microelementos com pH ajustado para 5,7 (Tabela 3).

Tabela 3. Composição do meio Murashige & Skoog (1962)

Componentes	Concentração (mg/L)
Macronutrientes:	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Micronutrientes:	
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
H ₃ BO ₃	6,2
KI	0,83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
FeEDTA:	
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,3
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
Glicina	2,0
Ácido Nicotínico	0,5
Piridoxina.HCl	0,5
Tiamina.HCl	0,1
Mio-inositol	100
Sacarose	30.000
Ágar-ágar	5.000

As sementes de berinjela e os brotos de batata foram desinfestados com etanol 70% e hipoclorito de sódio (cloro ativo 2%). O processo de desinfestação foi realizado em câmara de fluxo laminar, em condições assépticas, utilizando vidraria previamente esterilizada (Bringel, 1997; Bringel et al. 2001b). Uma semente ou um broto foi colocado em tubos, contendo meio de cultura e, em seguida, incubados durante 5 dias a 25-28 °C/8h no claro e 16 h no escuro.

O isolado UnB - 630, pertencente à biovar 3, foi incluído nos testes, atuando como testemunha.

A inoculação foi realizada após o quinto dia de incubação, com os diferentes isolados da bactéria (Tabela 1). Sob condições assépticas, depositou-se, com a alça de níquel cromo nº 22 de 3 mm de diâmetro, um volume de aproximadamente 0,005 mL da suspensão bacteriana de 10^8 ufc/mL sobre o meio de cultura, ao lado das plântulas. Em seguida, os tubos foram vedados com filme plástico e mantidos à temperatura de 25 °C para posteriores observações.

Foram feitas 5 observações com intervalos de dois dias, até o décimo dia após a inoculação, avaliando-se a turvação do meio ao redor das raízes, de acordo com uma escala diagramática previamente estabelecida (Bringel, 1997; Bringel et al., 2001b). A quantificação do desenvolvimento da bactéria na rizosfera foi feita segundo uma escala diagramática variável de 1 a 4 (Figura 3), onde 1 - representa a ausência de turvação do meio nas proximidades das raízes; 2 - escassa turvação do meio em apenas alguns pontos próximo das raízes; 3 - turvação do meio ao redor de aproximadamente 50 % das raízes e 4 - turvação intensa do meio em toda área adjacente às raízes. Esta avaliação foi feita incidindo-se a luz lateralmente nos tubos, dispostos contra um fundo escuro (Bringel, 1997; Bringel et al., 2001b).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 4 repetições para cada isolado, sendo que um tubo representou uma repetição.

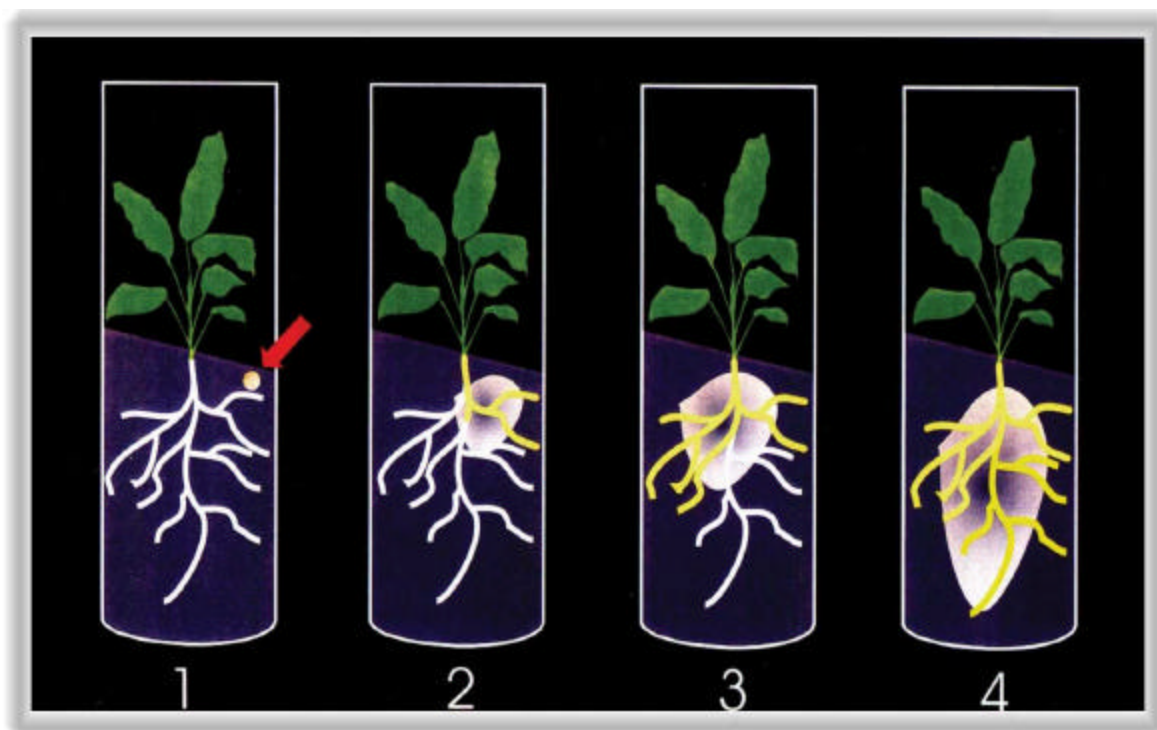


Figura 3 - Escala diagramática para avaliação do desenvolvimento de isolados de *Ralstonia solanacearum* na rizosfera de plantas de batata e berinjela *in vitro* (Bringel et al., 2001b).

3.3.4 Resistência a antibióticos e fungicidas

3.3.4.1 Obtenção de variantes de isolados de *Ralstonia solanacearum* biovar 2 com resistência múltipla a antibióticos.

O objetivo foi selecionar isolados com resistência múltipla a antibióticos para que pudessem ser usados em ensaios futuros. O emprego destes isolados possibilitariam avaliações mais confiáveis, pois usando-se meios de cultura acrescidos de antibióticos seria possível obter somente os isolados resistentes. Com isto, seria evitada a ocorrência de contaminantes que pudessem vir a dificultar a avaliação dos ensaios.

Os antibióticos foram acrescentados ao meio após a esterilização e antes de ser vertido em placas, a uma temperatura aproximada de 45 °C. Os antibióticos utilizados foram estreptomicina (E), rifampicina (R) e cloranfenicol (C). Estes antibióticos foram dissolvidos em água destilada estéril por agitação constante por 40 minutos a 200 rpm, sendo depois adicionados ao meio assepticamente.

Os isolados de *R. solanacearum* biovar 2 (Tabela 1) foram plaqueados em meio 523 contendo antibiótico. Foi utilizado para inoculação 0,005 ml da suspensão bacteriana de 10⁸ ufc/mL. Os testes foram conduzidos com 4 repetições, usando o delineamento estatístico inteiramente casualizado. Após incubação a 30 °C por 3 dias, o aparecimento de colônias brancas, brilhantes e fluidas foram consideradas como sendo das variantes resistentes e utilizadas para testes subsequentes de crescimento em dosagens crescentes de antibióticos.

A seleção foi iniciada com estreptomicina a 10 ppm e subsequentemente a 20, 30, 40 e 50 ppm. Para seleção de isolados

resistentes simultaneamente a estreptomicina e rifampicina, os isolados resistentes a 50 ppm de estreptomicina foram plaqueados em meios contendo dosagem fixa de 50 ppm de estreptomicina e doses de 10, 20, 30, 40 e 50 ppm de rifampicina. Da mesma maneira, para a obtenção de isolados resistentes aos três antibióticos, os isolados resistentes a 50 ppm de estreptomicina e 50 ppm rifampicina foram colocados para crescer em meio contendo dosagem fixas destes dois antibióticos a 50 ppm de cada antibiótico e doses de 10, 20, 30, 40 e 50 ppm de cloranfenicol.

3.3.4.2 Obtenção de variantes de isolados de *Ralstonia solanacearum* biovar 2 com resistência múltipla a antibióticos e fungicidas.

O ensaio teve como objetivo obter, dentre os isolados resistentes à estreptomicina, rifampicina e cloranfenicol, isolados também resistentes aos fungicidas benomyl e chlorothalonil.

Um volume de 0,1 mL de suspensões dos isolados resistentes na concentração de 10^8 ufc/mL, foi plaqueado em meio 523 contendo 50 ppm dos antibióticos (estreptomicina, rifampicina), 10 ppm do antibiótico (cloranfenicol) e 50 ppm de cada fungicidas (benomyl e chlorathalonil), com cinco repetições (5 placas de cada isolado). Os fungicidas foram dissolvidos em água destilada estéril por agitação constante por 40 minutos a 200 rpm, sendo depois adicionados ao meio assepticamente.

Após incubação a 30 °C por três dias, o aparecimento de colônias brancas, brilhantes e fluidas foram consideradas como sendo das variantes resistentes.

3.3.4.3 Avaliação do desenvolvimento da população de isolados de *Ralstonia solanacearum* biovar 2 em raízes de plantas de batata e berinjela cultivadas em vasos.

O ensaio teve por objetivo avaliar o desenvolvimento da população bacteriana dos diferentes isolados sobre a superfície ou nos tecidos internos das raízes de plantas de batata e berinjela, cultivadas no solo.

Plantas de batata (cultivares Achat e Monalisa) e berinjela (CNPH-175 e CNPH 110) foram inoculadas com os 51 isolados de *R. solanacearum* biovar 2 (Tabela 1). O desenvolvimento dos isolados foi avaliado através do número de unidades formadoras de colônia por peso de raiz (ufc/g).

Sementes de berinjela e brotos de batata foram plantados em bandejas contendo solo peneirado, adubado e autoclavado. Dois dias antes da inoculação, as plântulas foram transplantadas para vasos de 1,5 L, contendo o mesmo tipo de substrato usado nas bandejas.

A adubação foi feita através de aplicação quinzenal de adubo (25-15-10 + B + Zn), utilizando-se 100 mL/vaso da solução preparada na proporção de 30 g/L durante toda a fase de desenvolvimento das plantas.

Os isolados de *R. solanacearum* biovar 2 (Tabela 1) com resistência aos antibióticos e fungicidas foram cultivados em meio MB-1 e apenas as colônias claras, brilhantes e fluidas foram transferidas para o meio 523. Após 72 horas de incubação a 28 °C, as colônias selecionadas foram transferidas para frascos de Erlenmeyer de 1 litro contendo 240 mL de água esterilizada. A concentração foi ajustada a 10⁸ ufc/mL, em espectrofotômetro, a 550 nanômetros de comprimento de onda de acordo com a equação de regressão linear previamente estabelecida.

Plantas de berinjela e batata foram inoculadas com os 51 isolados, separadamente, através de 100 mL das suspensões bacterianas por vaso, incorporadas ao solo, aos vinte dias após a semeadura ou plantio dos brotos.

As coletas das amostras para avaliação dos resultados foram efetuadas 25 dias após a inoculação, sendo selecionadas raízes finas terminais para melhor homogeneização das amostras (Bringel et al., 2001a). Estes materiais foram acondicionados em sacos de papel previamente identificados para serem transportados da casa de vegetação para o Laboratório de Bacteriologia do Centro de Recursos Genéticos - Cenargen/Embrapa, onde foram processadas.

No laboratório, as amostras de raízes foram cuidadosamente lavadas, eliminado-se o excesso de solo, e cortadas em pedaços de 3,0 cm. Pesou-se 10 g de raízes que foram macerados em cadinho e diluídos em 90 mL de água esterilizada (diluição 1/10).

Alíquotas de 0,05 mL foram plaqueadas, com cinco repetições, em meio 523 acrescido dos antibióticos estreptomicina (50 ppm), rifampicina (50 ppm), cloranfenicol (10 ppm) e dos fungicidas benomyl (50 ppm) e chlorothalonil (50 ppm). As placas foram incubadas a 30 °C e as colônias brancas, brilhantes e fluidas, que se formaram entre 48 e 72 horas de incubação, foram contadas.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamentos, sendo que uma placa representou uma repetição.

3.3.5 Caracterização molecular de *Ralstonia solanacearum* biovar 2

3.3.5.1 Extração de DNA

3.3.5.1.2 Preparo dos isolados

Os 51 isolados de *R. solanacearum* biovar 2 (Tabela 1), mantidos em água esterilizada, foram cultivados em meio MB-1 a 28 °C, durante 72 horas. Apenas as colônias claras, brilhantes e fluidas foram transferidas, separadamente, para frascos de Erlenmeyer contendo 50 mL de meio líquido 523.

Uma alíquota de 5 µL de suspensão bacteriana de 10⁸ ufc/mL foi transferida para 50 mL de meio de cultura 523 líquido contido em frascos Erlenmeyer, os quais foram mantidos durante 20 horas, à temperatura de 28 °C e agitação constante. Um volume de 20 mL da suspensão bacteriana de cada isolado foi utilizado no processo de extração de DNA.

3.3.5.1.3 Extração do DNA genômico

O DNA genômico dos 51 isolados foi extraído conforme o método descrito por Graves & Swaminathan (1993). Um volume de 20 mL de meio 523 contendo células bacterianas de cada isolado foi centrifugado a 3000 rpm, por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se ao precipitado 3 mL de solução tampão (1mL Tris pH 8,0 1 M, 2 mL de NaCl 5 M e completar 100 mL de água destilada). Em seguida, homogeneizou-se em 'vortex' e adicionou-se 20 µL de lisozima (400 µg/µL). Após incubação a 37 °C por 2 horas, foram adicionados 200 µL de SDS 20 % (sódio-dodecyl-sulfato). As amostras foram

mantidas a 37 °C por aproximadamente 30 minutos e então foram adicionados 20 µL de proteinase K (20 µg/µL), 720 µL de NaCl 5 M e 600 µL de CTAB/NaCl (4,1 g NaCl e 10 g de CTAB em 100 mL de água). Após a incubação em banho-maria a 65 °C, por 10 minutos, e 37 °C, por 5 minutos, as proteínas foram removidas, por extração, com 600 µL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1), através de centrifugação (7000 rpm/15min.). Foi retirado o sobrenadante e colocado em novos tubos. Em seguida, foi adicionado igual volume de clorofórmio/álcool isoamílico. As amostras foram homogeneizadas, centrifugadas (5000 rpm/10min.), sendo retirado o sobrenadante e colocadas em novos tubos de Eppendorf. Foi adicionado às amostras etanol 95% e o DNA, precipitado a -20 °C, durante 15 horas. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e a secagem do precipitado foi feita colocando-se os tubos sobre papel toalha por, no mínimo, 2 horas. O precipitado de DNA foi re-suspendido em 50 µL de tampão TE (10 mM Tris e 1 nM EDTA, pH 8,0).

3.3.5.1.4 Condições de PCR

Os iniciadores (primers) ERIC1R [5' - ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC - 3'], ERIC2R [5' - AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG - 3'], BOXA1R [5' - CTACGGCAAGGCGACGCTGACG - 3'], REP1 R-I [5' - IIIICGICGICATCIGGC - 3'] e REP2 R-1 [5' - ICGICTTATCIGGCCTAC - 3'] (Louws et al., 1994) foram utilizados para amplificação do DNA dos fragmentos alvos para cada isolado, de acordo com as condições descritas por Martins (2000). Algumas alterações foram realizadas na reação de PCR conforme descrito a seguir. Foram adicionados 2 µL (50 ng) e 1 µL (25 ng) da amostra de DNA extraído de cada isolado à reação

de amplificação, para cada um dos conjuntos de iniciadores ERIC, REP e BOX.

Para o iniciador ERIC, o volume final da reação (30 μ L) foi constituído tampão de PCR 1X (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8,3] 0,1 % Triton X 100), 3 mM de MgCl₂, 50 pmol de cada iniciador, 1,25 mM de dNTP e 2 U de Taq DNA polymerase (Promega, Madison, WI, EUA). A amplificação foi realizada em termociclador (Geneamp PCR system - Perkin-Elmer, Norwalk, CT, EUA), utilizando o seguinte programa: uma etapa inicial a 95 °C por 7 minutos; 30 ciclos constituídos por uma etapa de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, uma etapa de anelamento a 52 °C por 1 minuto e uma etapa de extensão a 65 °C por 8 minutos; uma etapa final de extensão a 65 °C por 15 minutos.

Para os iniciadores BOX e REP, o volume total da reação foi de 25 μ L contendo 2,5 μ L tampão de PCR (GIBCO) 1X (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8,3] 0,1 % Triton X 100), 2,5 mM de MgCl₂, 50 pmol de cada iniciador, 1 mM de dNTP e 1 U de Taq DNA polymerase (Promega, Madison, WI, EUA). A amplificação foi realizada em termociclador (Geneamp PCR system - Perkin-Elmer, Norwalk, CT, EUA), utilizando o seguinte programa: uma etapa inicial a 95 °C por 7 minutos; 30 ciclos constituído por uma etapa de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, uma etapa de anelamento a 55 °C para BOX por 1 minuto e para REP 45 °C por 1 minuto, e uma etapa de extensão a 65 °C por 8 minutos; uma etapa final de extensão a 65 °C por 15 minutos.

O produto amplificado por PCR foi armazenado a 4 °C. Alíquotas de 5 a 10 μ L do produto foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 1 %. Após corrida em tampão 0,5X TBE por 2 h à 100 V/cm, o gel foi corado com brometo de etídio e fotografado em fotodocumentador ImageMaster VDS sob luz UV. O marcador utilizado foi 1 Kb DNA Lader.

Uma matriz contendo os dados foi criada utilizando-se código (+) e (-) para presença ou ausência de determinada banda em posição específica para cada isolado.

Dendrogramas foram obtidos por meio da análise de matriz de similaridade gerada com a utilização do algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean) no programa NTSYS - pc (versão 1.8, Exeter Biological Software, Setauket, NY), usando o coeficiente de similaridade de Sorensen. A análise de agrupamento foi obtida pelos dados gerados por cada iniciador e pela combinação destes iniciadores.

4 RESULTADOS

4.1 Obtenção de isolados de *Ralstonia solanacearum*

Isolados de *R. solanacearum*, de batata e berinjela, pertencentes a biovar 2, e provenientes de diferentes regiões geográficas foram recuperados com sucesso a partir da coleção de culturas da Embrapa-Hortaliças.

Os 51 isolados, sendo 9 de berinjela e 42 de batata, foram caracterizados por colônias de coloração branca e fluidas, as quais apresentaram dimensões variadas. Estas observações foram feitas tanto para as colônias crescidas nos meios MB-1 e 523, quanto para aquelas cultivadas no meio de cultura seletivo de Kelman (1953).

4.2 Padronização de idade dos isolados de *Ralstonia solanacearum* biovar 2

Para todos os 51 isolados inoculados em plantas de batata e posteriormente isolados em meio 523, foram obtidas colônias brancas, fluidas e de tamanho variado. Estes isolados passaram a ser empregados nos demais ensaios. Desta maneira, todos os isolados *R. solanacearum* utilizados nos ensaios componentes deste trabalho foram padronizados em termos de tempo de isolamento.

4.3 Avaliação dos aspectos culturais de *Ralstonia solanacearum* biovar 2 em meio de cultura.

Colônias dos 51 isolados, após 48 horas de crescimento, revelaram as características apresentadas na tabela 4. Quanto ao tamanho, foram encontradas em 9 isolados, colônias do tipo pequeno, com diâmetro menor ou aproximadamente de 0,4 mm, 32 isolados apresentaram colônias médias, com diâmetro compreendido entre 0,4 - 0,8 mm, e 10 isolados apresentaram colônias grandes, com diâmetro variável de 0,8 a 1,5 mm. Em relação à coloração, todos os isolados apresentaram colônias brancas, típicas desta espécie bacteriana. O aparecimento de mutantes foi verificado em 7 isolados, sendo eles CNPH - 57, CNPH - 65, CNPH - 83, CNPH - 95, CNPH - 96, CNPH - 97, CNPH - 157, sendo o isolado CNPH-83 obtido de berinjela e os demais de batata.

As bactérias mutantes foram identificadas por apresentar uma coloração amarela, não fluida, de formato e tamanho irregular.

Foi observada a produção de melanina em 18 isolados de *R. solanacearum* como segue: CNPH - 65, CNPH - 66, CNPH - 69, CNPH - 71, CNPH - 77, CNPH - 79, CNPH - 90, CNPH - 96, CNPH - 97, CNPH - 98, CNPH - 99, CNPH - 111, CNPH - 131, CNPH - 132, CNPH - 134, CNPH - 141, CNPH - 165 e CNPH - 173. Observou-se uma maior produção de melanina nos isolados CNPH - 66, CNPH - 77, CNPH - 111 e CNPH - 141 (Figura 4), não sendo observada esta produção após sucessivas repicagens.

Tabela 4. Características culturais de isolados de *Ralstonia solanacearum* em meio de cultura 523, avaliados 48 h após repicagem.

Isolado CNPQ n°	Colônia	Coloração	Presença Mutante	Número Colônias	Presença Melanina
71*	P	B	N	26	S
77*	M	B	N	32	S
79*	M	B	N	36	S
81*	M	B	N	29	N
82*	G	B	N	41	N
83*	P	B	S	21	N
84*	M	B	N	52	N
87*	M	B	N	36	N
89*	M	B	N	42	N
2	G	B	N	26	N
44	P	B	N	28	N
57	P	B	S	62	N
65	M	B	S	16	S
66	M	B	N	52	S
67	M	B	N	41	N
68	M	B	N	63	N
69	G	B	N	32	S
70	G	B	N	35	N
90	M	B	N	36	S
91	M	B	N	41	N
92	P	B	N	29	N
94	M	B	N	62	N
95	M	B	S	42	N
96	G	B	S	52	S
97	M	B	S	32	S

Tabela 4. Características culturais de isolados de *Ralstonia solanacearum* em meio de cultura 523, avaliados 48 h após repicagem.

Isolado CNPH nº	Colônia	Coloração	Presença Mutante	Número Colônias	Presença Melanina
98	M	B	N	22	S
99	G	B	N	36	S
107	M	B	N	35	N
111	M	B	N	24	S
113	M	B	N	62	N
115	M	B	N	33	N
120	P	B	N	53	N
130	P	B	N	63	N
131	P	B	N	43	S
132	M	B	N	41	S
133	M	B	N	42	N
134	M	B	N	45	S
135	M	B	N	41	N
137	M	B	N	21	N
138	M	B	N	41	N
139	M	B	N	43	N
140	G	B	N	63	N
141	M	B	N	26	S
153	M	B	N	25	N
154	M	B	N	29	N
156	M	B	N	51	N
157	G	B	S	53	N
162	G	B	N	23	N
164	G	B	N	42	N
165	M	B	N	31	S
173	P	B	N	23	S

* Isolados obtidos de berinjela, CNPH - Centro Nacional de Pesquisa em Hortaliças, P - Colônia pequena, M - Colônia média, G - Colônia grande, B - Coloração branca, S - Sim, N - Não

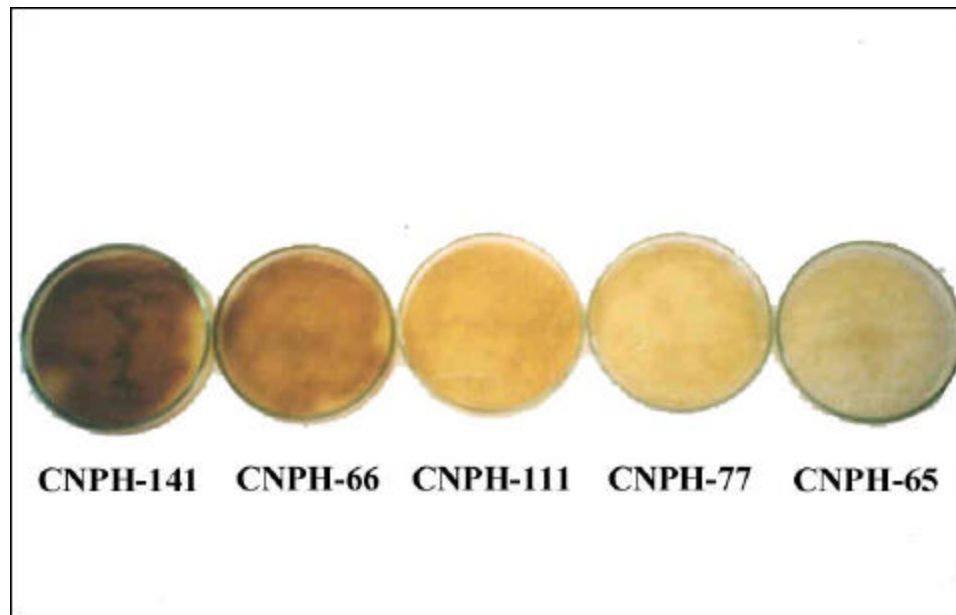


Figura 4 - Variação na produção de melanina entre os isolados de *Ralstonia solanacearum*.

4.4 Teste de oxidação-fermentação (OF ou teste de crescimento anaeróbico)

A avaliação do teste demonstrou ausência quanto à alteração de coloração do meio de cultura no qual cada um dos 51 isolados de *R. solanacearum* se desenvolveu. Portanto, o resultado deste teste foi negativo, evidenciando a ausência de bactérias do gênero *Erwinia* entre os isolados de *R. solanacearum* testados. No entanto, o isolado de *Erwinia*, utilizado como testemunha, provocou alteração da coloração do meio de verde para amarela, caracterizando atividade metabólica em condições anaeróbicas.

4.5 Utilização de asparagina como fonte única de carbono e nitrogênio, produção de pigmentação fluorescente em meio King e PBHB (coloração de grânulos de poli-b-Hidroxibutirato)

Colônias de *R. solanacearum* surgiram aproximadamente 3 dias após a repicagem para meio de clara, no qual foi usado asparagina como fonte única de carbono e nitrogênio. Estas colônias apresentaram forma circular, coloração branca, fluida e tamanho variado. A presença das colônias caracterizou resultado positivo do teste para todos isolados avaliados.

No teste de pigmentação fluorescente em meio King, foi constatado que os 51 isolados de *R. solanacearum* não formaram pigmento amarelo-esverdeado (pioverdina) difundido ao redor das colônias.

Os testes PBHB (coloração de grânulos de poli- β -hidroxibutirato) confirmaram os resultados do teste de pigmentação fluorescente em meio King, isto é, em todos os isolados foi observada a presença de inclusões citoplasmáticas de coloração azul-escura, característica das bactérias que acumulam PBHB e que pertencem ao grupo das bactérias não fluorescente.

Assim, ficou demonstrado que todos os isolados utilizados neste trabalho pertenciam ao gênero *Ralstonia*.

4.6 Classificação dos isolados em biovars

Os resultados dos testes de caracterização de biovars mostraram que os 51 isolados de *R. solanacearum* produziram ácido a partir dos três açúcares testados, ou seja, lactose, maltose e celobiose (Tabela 5). No entanto, não foi constatada a produção de ácidos a partir dos três álcoois (manitol, sorbitol e dulcitol). A testemunha, UnB - 630 biovar 3, apresentou formação de ácidos a partir dos açúcares e álcoois testados.

Os resultados destes testes demonstraram que os 51 isolados *R. solanacearum* pertenciam à biovar 2.

Os nove isolados de berinjela foram capazes de utilizar trealose como única fonte de carbono, enquanto que todos os isolados de batata testados não utilizaram esta fonte de carbono. Assim, ficou confirmado que os isolados de batata pertenciam à biovar 2-A, enquanto aqueles de berinjela, à biovar 2-T.

Tabela 5. Classificação dos isolados de *Ralstonia solanacearum* em biovares

Isolados	L	Ma	C	Mo	D	S	T
Batata	+	+	+	-	-	-	-
Berinjela	+	+	+	-	-	-	+
Testemunha	+	+	+	-	-	-	-

L - Lactose, Ma - Maltose, C - Celobiose, Mo - Manitol, D - Dulcitol, S - Sorbitol, T - Trealose,

+ : reação positiva, - : reação negativa

4.7 Avaliação da agressividade de isolados de *Ralstonia solanacearum* biovar 2 em berinjela e batata

A análise de agressividade dos isolados foi feita com base nas avaliações realizadas no quinto e décimo dias após a inoculação (Tabela 6). As cultivares testadas mostraram diferenças significativas entre si, porém os padrões de resistência previamente conhecidos foram mantidos, não sendo observada quebra de resistência em relação a qualquer isolado. Entre os isolados, apenas o CNPH-65 diferiu dos demais (Tabela 6). Os isolados obtidos de batata e de berinjela apresentaram o mesmo comportamento, quando inoculados nas cultivares utilizadas neste ensaio, não tendo sido possível distinguir um grupo do outro, ou seja, aparentemente não existe especificidade dos isolados em relação à espécie hospedeira.

As avaliações confirmaram a cultivar de batata Monalisa como sendo suscetível em relação à cultivar Achat, o mesmo ocorrendo para berinjela, onde a cultivar CNPH-110 mostrou-se mais suscetível que CNPH-175. Os resultados obtidos serviram para confirmar que os isolados tiveram um comportamento semelhante quanto à agressividade, quando inoculados em genótipos com diferentes níveis de resistência. Apenas na cultivar Monalisa foi possível diferenciar alguns isolados, com base na reação à inoculação. Assim, os isolados CNPH-94 e CNPH-132 se apresentaram significativamente mais agressivos que os isolados CNPH-2, CNPH-67, CNPH-69, CNPH-70, CNPH-71 e CNPH-157 (Tabela 6).

O isolado CNPH-65, obtido de batata e procedente de Ibicoara-BA, diferiu estatisticamente de todos os demais isolados testados. Este isolado, além de não causar doença, promoveu um desenvolvimento vegetativo diferenciado nas plantas de ambas as cultivares de batata. As plantas inoculadas com este isolado apresentaram um porte maior que as plantas testemunhas tratadas somente com água (Figura 5).

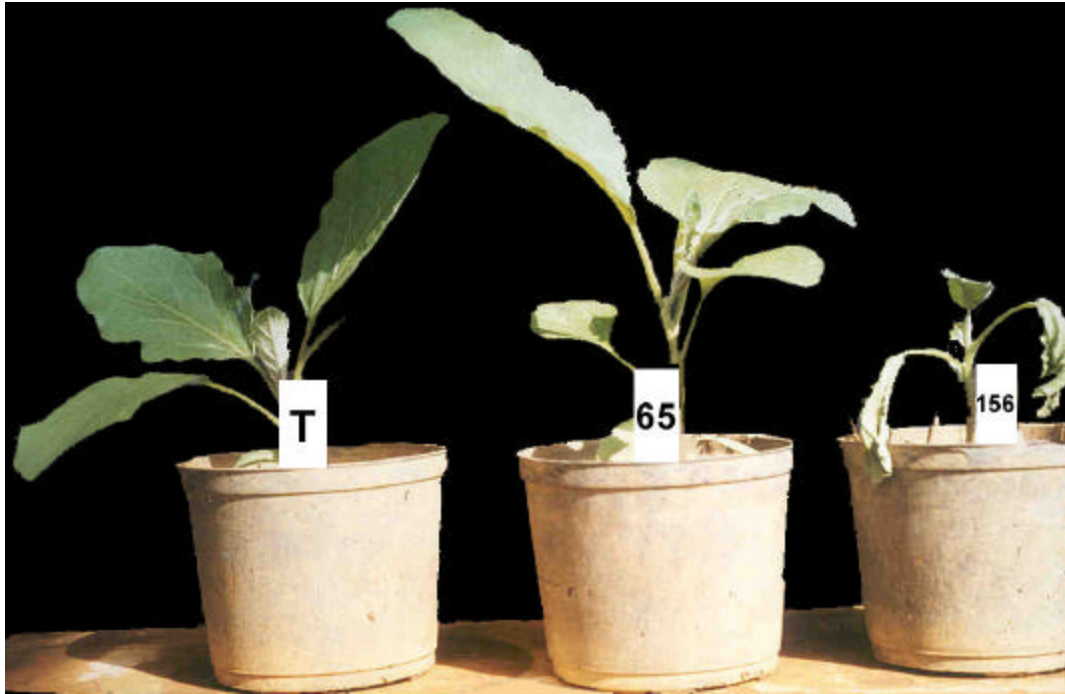


Figura 5 - Desenvolvimento vegetativo atípico em planta de batata provocado pelo isolado CNPH - 65 de *Ralstonia solanacearum* obtido de batata.

Tabela 6. Agressividade de isolados de *Ralstonia solanacearum* biovar 2, avaliada em dois genótipos de batata e berinjela, medida aos 5 e 10 dias após a inoculação.

ISOLADO CNPH nº	LEITURA (5º DIA)		LEITURA (10º DIA)		PROCEDÊNCIA
	Achat	Monalisa	CNPH - 175	CNPH - 110	
71*	1,50 ab	2,00 b	2,00 a	4,00 a	Alexandre Gusmão-DF
77*	1,25 ab	3,50 ab	1,50 ab	4,75 a	Alexandre Gusmão-DF
79*	1,25 ab	3,00 ab	2,00 a	4,50 a	Alexandre Gusmão-DF
81*	1,50 ab	3,50 ab	2,00 a	4,25 a	Alexandre Gusmão-DF
82*	1,50 ab	3,00 ab	2,50 a	4,50 a	Alexandre Gusmão-DF
83*	1,50 ab	3,25 ab	2,25 a	3,75 a	Alexandre Gusmão-DF
84*	1,25 ab	3,50 ab	2,50 a	4,50 a	Alexandre Gusmão-DF
87*	1,25 ab	3,00 ab	2,25 a	4,75 a	Alexandre Gusmão-DF
89*	1,25 ab	3,00 ab	1,75 a	4,75 a	Alexandre Gusmão-DF
2	1,50 ab	2,00 b	2,25 a	4,50 a	UnB-DF
44	1,50 ab	3,25 ab	1,75 a	5,00 a	Brasília-DF
57	1,00 ab	3,00 ab	2,25 a	4,50 a	Vargem Bonita-DF
65	1,00 c	1,00 c	1,00 b	1,00 b	Ibicoara-BA
66	1,50 ab	2,25 ab	1,50 ab	4,25 a	Ibicoara-BA
67	1,50 ab	2,00 b	2,50 a	4,50 a	Ibicoara-BA
68	1,50 ab	2,25 ab	2,50 a	4,50 a	Ibicoara-BA
69	1,50 ab	2,00 b	2,25 a	4,25 a	Ibicoara-BA
70	1,50 ab	2,00 b	2,75 a	4,25 a	Ibicoara-BA
90	1,25 ab	2,50 ab	2,75 a	4,00 a	Brasília -DF
91	1,50 ab	3,00 ab	2,75 a	4,75 a	Brasília -DF
92	1,25 ab	3,00 ab	2,25 a	4,75 a	Brasília -DF
94	1,50 ab	3,75 a	2,75 a	5,00 a	Piraí do Sul-PR
95	1,50 ab	3,25 ab	1,75 a	4,75 a	Piraí do Sul-PR
96	1,25 ab	3,00 ab	2,50 a	5,00 a	Piraí do Sul-PR
97	1,50 ab	3,50 ab	2,00 a	4,00 a	Piraí do Sul-PR

Tabela 6. Agressividade de isolados de *Ralstonia solanacearum* biovar 2, avaliada em dois genótipos de batata e berinjela, medida aos 5 e 10 dias após a inoculação.

ISOLADO CNPH nº	LEITURA (5 ^o DIA)		LEITURA (10 ^o DIA)		PROCEDÊNCIA
	Achat	Monalisa	CNPH - 175	CNPH - 110	
98	1,25 ab	3,25 ab	2,75 a	4,50 a	Piraí do Sul-PR
99	2,00 a	3,00 ab	1,50 ab	3,75 a	Piraí do Sul-PR
107	1,50 ab	3,00 ab	1,50 ab	4,00 a	Araucária-PR
111	1,25 ab	3,50 ab	2,25 a	4,50 a	Cotenda-PR
113	1,25 ab	2,75 ab	1,50 ab	4,50 a	Mariental-PR
115	1,50 ab	2,75 ab	1,50 ab	4,00 a	Lapa -PR
120	1,75 a	2,75 ab	1,75 a	4,50 a	Lapa -PR
130	1,50 ab	2,75 ab	2,00 a	4,25 a	Araucária-PR
131	1,25 ab	2,75 ab	1,75 a	4,75 a	Araucária-PR
132	1,50 ab	3,75 a	2,75 a	5,00 a	Araucária-PR
133	1,25 ab	3,50 ab	2,00 a	4,50 a	Araucária-PR
134	1,50 ab	3,50 ab	2,50 a	3,75 a	Contenda -PR
135	1,50 ab	3,25 ab	2,75 a	4,50 a	Contenda -PR
137	1,50 ab	3,25 ab	2,25 a	4,50 a	Contenda -PR
138	1,25 ab	3,00 ab	2,00 a	5,00 a	Lapa -PR
139	1,50 ab	2,75 ab	2,00 a	5,00 a	Lapa -PR
140	1,50 ab	2,75 ab	2,00 a	4,50 a	Lapa -PR
141	1,25 ab	2,50 ab	1,75 a	4,00 a	Lapa -PR
153	1,50 ab	3,25 ab	1,50 ab	4,00 a	Guarapuava-PR
154	1,25 ab	3,50 ab	1,50 ab	3,75 a	Guarapuava-PR
156	1,50 ab	2,50 ab	2,00 a	3,75 a	Cristalina-GO
157	1,50 ab	2,00 b	1,75 a	4,50 a	Cristalina-GO
162	1,50 ab	3,00 ab	1,75 a	4,25 a	André da Rocha-RS
164	1,50 ab	3,25 ab	1,75 a	4,25 a	Nova Prata -RS
165	1,50 ab	3,25 ab	2,75 a	4,25 a	Nova Prata -RS
173	1,75 a	3,25 ab	2,00 a	4,75 a	Brasília-DF
T	1,00 c	1,00 c	1,00 b	1,00 b	

* Isolados obtidos de berinjela

Letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey, ao nível de 1% de probabilidade.

4.8 Avaliação do desenvolvimento de isolados de *Ralstonia solanacearum* biovar 2 na rizosfera de plantas de batata e berinjela, *in vitro*.

Todos os isolados de *R. solanacearum* biovar 2 promoveram turvação intensa na rizosfera das plantas de batata e de berinjela,

crescidas em meio de cultura, recebendo a nota máxima da escala diagramática adotada na avaliação. No entanto, o isolado testemunha (UnB - 630/biovar 3) não se desenvolveu na rizosfera de plantas de batata e de berinjela.

4.9 Obtenção de variantes dos isolados de *Ralstonia solanacearum* biovar 2 com resistência múltipla a antibióticos e fungicidas.

Os 51 isolados *R. solanacearum* biovar 2 se mostraram resistentes simultaneamente aos antibióticos e fungicidas testados. Foi considerado resultado positivo quando pelo menos uma colônia da bactéria era observada no meio de cultura 523 contendo os antibióticos e os fungicidas.

4.10 Avaliação do desenvolvimento da população de isolados de *Ralstonia solanacearum* biovar 2 em raízes de plantas de batata e berinjela cultivadas em vasos.

Em relação à batata, todos os isolados da bactéria se desenvolveram melhor no sistema radicular das plantas pertencentes à cultivar Monalisa do que naquelas pertencentes à cultivar Achat (Tabela 7). O desenvolvimento populacional, medido em termos de ufc/g de raiz, foi significativamente maior nas raízes das plantas suscetíveis do que nas raízes das plantas resistentes. Para berinjela, também ficou demonstrado que os isolados testados se desenvolveram significativamente melhor no sistema radicular das plantas da cultivar suscetível CNPH-110, do que nas raízes da cultivar resistente CNPH-175 (Tabela 7).

Considerando-se individualmente cada variedade, independentemente de pertencer a batata ou berinjela, os isolados não apresentaram diferença significativa quanto ao seu desenvolvimento no sistema radicular de plantas (Tabela 7).

Tabela 7. Desenvolvimento da população de *Ralstonia solanacearum* no sistema radicular de plantas de batata e berinjela, inoculadas com 51 isolados do patógeno pertencentes à biovar 2 e avaliado na forma de unidade formadora de colônia por peso de raiz (ufc/g).

Isolado CNPH nº	Batata (cv. Achat)	Batata (cv. Monalisa)	Berinjela (cv. CNPH - 175)	Berinjela (cv. CNPH - 110)
Médias ufc/g de raiz X 100				
71*	15,62 a** A***	25,20 a B	10,32 a A	19,36 a B
77*	14,36 a A	19,23 a B	9,23 a A	22,03 a B
79*	10,60 a A	26,30 a B	13,06 a A	25,01 a B
81*	11,23 a A	19,90 a B	13,22 a A	30,21 a B
82*	9,36 a A	22,36 a B	10,01 a A	26,22 a B
83*	8,97 a A	23,65 a B	14,23 a A	19,32 a B
84*	10,26 a A	21,22 a B	13,06 a A	19,50 a B
87*	15,36 a A	29,10 a B	9,89 a A	20,01 a B
89*	14,29 a A	26,00 a B	13,21 a A	23,20 a B
2	11,20 a A	24,30 a B	11,05 a A	21,03 a B
44	13,15 a A	25,32 a B	10,26 a A	26,04 a B
57	14,21 a A	24,16 a B	13,02 a A	20,00 a B
65	11,20 a A	20,36 a B	13,25 a A	23,33 a B
66	13,26 a A	25,36 a B	14,31 a A	26,10 a B
67	10,25 a A	22,24 a B	10,01 a A	19,36 a B
68	14,21 a A	25,21 a B	10,65 a A	22,34 a B
69	14,25 a A	23,10 a B	13,25 a A	25,11 a B
70	10,00 a A	19,91 a B	12,06 a A	21,11 a B
90	13,23 a A	25,23 a B	13,04 a A	23,22 a B
91	11,25 a A	22,36 a B	13,25 a A	25,16 a B

Tabela 7. Desenvolvimento da população de *Ralstonia solanacearum* no sistema radicular de plantas de batata e berinjela, inoculadas com 51 isolados do patógeno pertencentes à biovar 2 e avaliado na forma de unidade formadora de colônia por peso de raiz (ufc/g).

Isolado	Batata (cv. Achat)	Batata (cv. Monalisa)	Berinjela (cv. CNPH - 175)	Berinjela (cv. CNPH - 110)
	Médias ufc/g de raiz X 100			
92	13,26 a A	21,32 a B	13,67 a A	24,10 a B
94	12,03 a A	25,10 a B	14,57 a A	23,10 a B
95	14,05 a A	26,12 a B	10,76, a A	23,25 a B
96	12,00 a A	20,23 a B	13,26 a A	26,21 a B
97	13,25 a A	21,63 a B	12,85 a A	19,23 a B
98	10,12 a A	19,23 a B	11,01 a A	19,65 a B
99	11,01 a A	21,30 a B	10,87 a A	23,00 a B
107	15,36 a A	21,36 a B	16,23 a A	21,00 a B
111	13,63 a A	25,13 a B	15,25 a A	25,00 a B
113	11,10 a A	27,00 a B	14,26 a A	26,32 a B
115	13,25 a A	36,25 a B	14,30 a A	19,32 a B
120	13,21 a A	23,21 a B	13,20 a A	19,69 a B
130	14,03 a A	20,00 a B	11,02 a A	19,90 a B
131	9,93 a A	19,60 a B	11,23 a A	21,00 a B
132	11,02 a A	20,04 a B	16,23 a A	20,06 a B
133	9,32 a A	23,02 a B	12,25 a A	25,13 a B
134	8,62 a A	26,05 a B	10,02 a A	26,13 a B
135	12,03 a A	25,23 a B	13,05 a A	25,01 a B
137	11,05 a A	21,13 a B	9,87 a A	23,10 a B
138	14,68 a A	21,00 a B	8,36 a A	19,01 a B
139	13,25 a A	25,00 a B	11,02 a A	26,05 a B
140	13,26 a A	26,32 a B	14,25 a A	13,29 a B
141	11,02 a A	21,03 a B	12,01 a A	23,25 a B
153	13,02 a A	26,36 a B	13,09 a A	19,36 a B
154	15,01 a A	29,00 a B	9,38 a A	19,46 a B
156	13,02 a A	25,00 a B	15,00 a A	20,08 a B
157	9,23 a A	23,03 a B	13,26 a A	23,04 a B
162	8,62 a A	26,23 a B	12,01 a A	23,51 a B
164	11,06 a A	21,32 a B	13,01 a A	26,13 a B
165	11,02 a A	25,03 a B	13,24 a A	21,00 a B
173	13,23 a A	26,23 a B	10,86 a A	19,96 a B

CNPH - Centro Nacional de Pesquisa em Hortaliças; ufc - Unidade Formadora de Colônia; * isolados de berinjela; * * Valores seguidos da mesma letra minúscula entre linhas não diferem estatisticamente ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey; * * * Valores seguidos da mesma letra maiúscula entre colunas não diferem estatisticamente ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.

4.11 Análise de seqüências repetitivas de DNA amplificadas com os iniciadores ERIC, BOX e REP (rep-PCR)

A diversidade genética entre os 51 isolados de *R. solanacearum* foi avaliada pela comparação de haplótipos gerados por elementos repetitivos amplificados por rep-PCR. Somente os fragmentos de DNA que apresentaram alta intensidade e mantiveram-se constantes entre as repetições realizadas foram analisados. Haplótipos de isolados que mostraram perfil similar com variações apenas na intensidade das bandas foram considerados idênticos.

O padrão eletroforético gerado pela amplificação dessas seqüências conservadas e repetitivas no DNA genômico de *R. solanacearum* resultou em múltiplos produtos com variação no tamanho de aproximadamente 340 a 3.054 pb com o iniciador BOX (Figura 6), 344 a 3.054 pb com o iniciador ERIC (Figura 7) e 344 a 1.100 pb para o iniciador REP (Figura 8).

A comparação entre os padrões de bandas de fragmentos de DNA genômico amplificado revelou quatro grupos distintos para os iniciadores BOX (Figuras 6 e 9) e ERIC (Figuras 7 e 10). Para os iniciadores REP, 5 grupos distintos foram revelados (Figuras 8 e 11). Os mesmos isolados constituíram o grupo I para os iniciadores BOX, ERIC e REP. Isto também foi observado para os grupos II e III para os 3 iniciadores empregados. O grupo IV também congregou os mesmos isolados para os iniciadores BOX, ERIC e REP, exceção feita ao isolado CNPH-137 que apresentou um perfil distinto dos demais isolados, para o iniciador REP (Tabela 8). Todos os isolados de berinjela ficaram no mesmo grupo (grupo III), independentemente do uso deste ou daquele iniciador, demonstrando alta similaridade genética entre os mesmos. Este grupo se mostrou distinto dos demais grupos, que eram constituídos por isolados de batata. No entanto, o isolado CNPH-2 foi o único isolado de batata incluído no grupo formado pelos isolados de berinjela (Tabela 8). Os isolados de batata foram distribuídos em 4

grupos (Tabela 8). De um total de 42 isolados, 13 foram reunidos no grupo I, 14 no grupo II e 14 no grupo IV para os iniciadores BOX e ERIC. Para os iniciadores REP, 13 isolados ficaram no grupo IV e 1 no grupo V. Finalmente, um dos isolados de batata (CNPH-2) se enquadrou no grupo III, juntamente com os 9 isolados de berinjela.

Os haplótipos obtidos com os iniciadores ERIC, BOX e REP foram analisados em conjunto, e os resultados confirmaram a ocorrência de cinco grupos distintos (Figura 12).

Os dendrogramas construídos com base na similaridade dos haplótipos determinados pelos iniciadores ERIC, BOX e REP entre os isolados de *R. solanacearum*, demonstraram um coeficiente de similaridade superior a 90 %, permitindo distinguir quatro grupos distintos para os iniciadores ERIC e BOX, e cinco grupos para o iniciador REP (Figuras 9, 10, 11 e 12).

Tabela 8. Agrupamento dos isolados de *Ralstonia solanacearum* de acordo com os padrões de bandas de fragmentos de DNA genômico amplificado, obtidos com os iniciadores ERIC, BOX e REP.

Iniciadores	Isolado CNPH nº				
	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V
BOX	94, 95, 96,	44, 57,65,	2, 71*, 77*,	99, 107, 130,	-
	97, 98, 111,	66, 67, 68	79*, 81*, 82*,	131, 132,	
	115, 141,	69, 70, 90,	83*, 84*, 87*,	133, 134,	
	153, 154,	91, 92,	89*	135, 137,	
	156, 157	113, 120,		138, 139,	
	164	165		140, 162, 173	
ERIC	94, 95, 96,	44, 57,65,	2, 71*, 77*,	99, 107, 130,	-
	97, 98, 111,	66, 67, 68	79*, 81*, 82*,	131, 132,	
	115,141,153	69, 70, 90,	83*, 84*, 87*,	133, 134,	
	154, 156	91, 92,	89*	135, 137,	
	157, 164	113, 120,		138, 139,	
		165		140, 162, 173	
REP	94, 95, 96,	44, 57, 65,	2, 71*, 77*,	99, 107, 130,	137
	97, 98, 111,	66, 67, 68,	79*, 81*, 82*,	131, 132,	
	115, 141,	69, 70, 90,	83*, 84*, 87*,	133, 134,	
	153, 154,	91, 92,	89*	135, 138,	
	156, 157,	113, 120,		139, 140,	
	164	165		162, 173	

CNPH – Centro Nacional de Pesquisa em Hortaliças – Embrapa-DF

* Isolado de berinjela

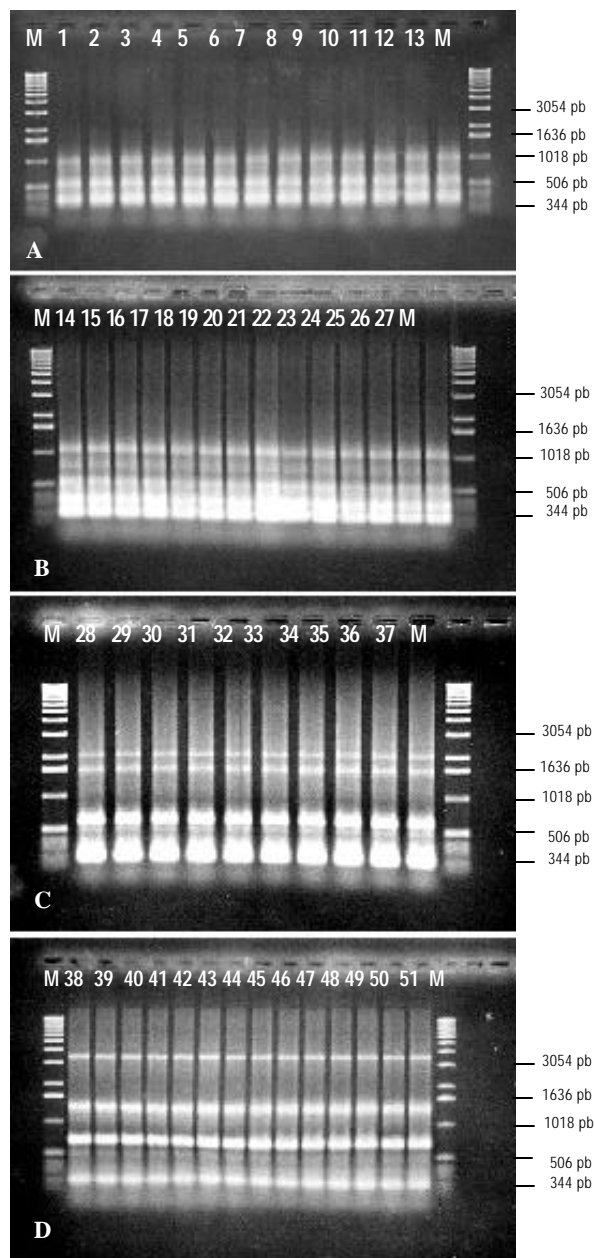


Figura 6 - Perfis eletroforéticos obtidos pela amplificação de fragmentos de DNA de isolados de *Ralstonia solanacearum* através de PCR, utilizando o iniciador BOX. Os isolados estão representados da esquerda para direita (1 = CNPH - 141, 2 = CNPH - 153, 3 = CNPH - 154, 4 = CNPH - 156, 5 = CNPH - 157, 6 = CNPH - 164, 7 = CNPH - 94, 8 = CNPH - 96, 9 = CNPH - 98, 10 = CNPH - 95, 11 = CNPH - 97, 12 = CNPH - 115, 13 = CNPH - 111, 14 = CNPH - 113, 15 = CNPH - 65, 16 = CNPH - 120, 17 = CNPH - 66, 18 = CNPH - 67, 19 = CNPH - 68, 20 = CNPH - 69, 21 = CNPH - 70, 22 = CNPH - 165, 23 = CNPH - 90, 24 = CNPH - 91, 25 = CNPH - 92, 26 = CNPH - 44, 27 = CNPH - 57, 28 = CNPH - 82, 29 = CNPH - 84, 30 = CNPH - 87, 31 = CNPH - 89, 32 = CNPH - 2, 33 = CNPH - 71, 34 = CNPH - 83, 35 = CNPH - 77, 36 = CNPH - 79, 37 = CNPH - 81, 38 = CNPH - 138, 39 = CNPH - 139, 40 = CNPH - 140, 41 = CNPH - 162, 42 = CNPH - 173, 43 = CNPH - 130, 44 = CNPH - 131, 45 = CNPH - 133, 46 = CNPH - 134, 47 = CNPH - 135, 48 = CNPH - 137, 49 = CNPH - 132, 50 = CNPH - 99, 51 = CNPH - 107). Primeira e última coluna marcador molecular 1 Kb DNA Ladder.

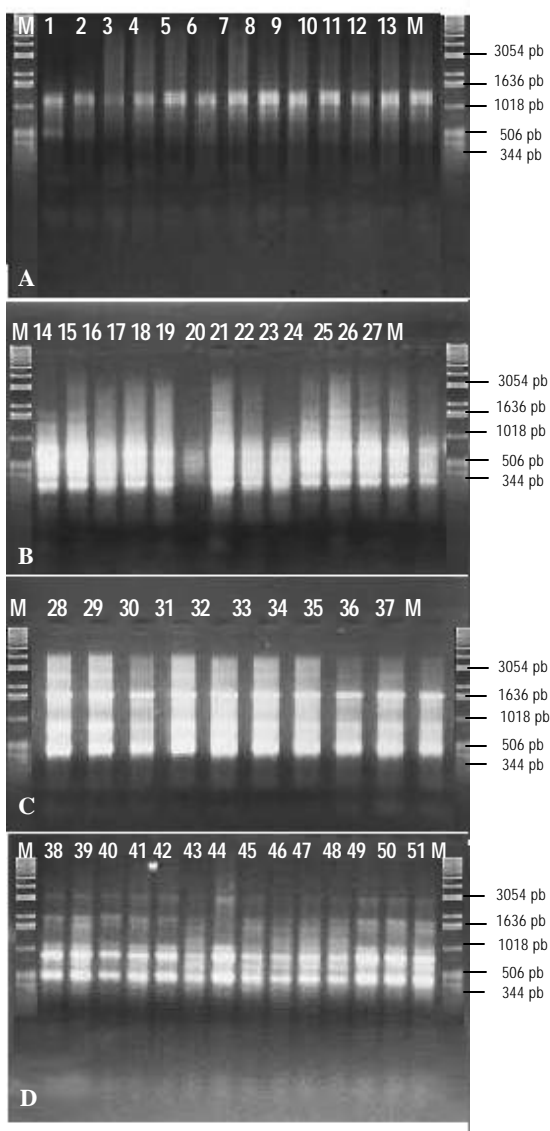


Figura 7 - Perfis eletroforéticos obtidos pela amplificação de fragmentos de DNA de isolados de *Ralstonia solanacearum* através de PCR, utilizando o iniciador ERIC. Os isolados estão representados da esquerda para direita (1 = CNPH - 141, 2 = CNPH - 153, 3 = CNPH - 154, 4 = CNPH - 156, 5 = CNPH - 157, 6 = CNPH - 164, 7 = CNPH - 94, 8 = CNPH - 96, 9 = CNPH - 98, 10 = CNPH - 95, 11 = CNPH - 97, 12 = CNPH - 115, 13 = CNPH - 111, 14 = CNPH - 113, 15 = CNPH - 65, 16 = CNPH - 120, 17 = CNPH - 66, 18 = CNPH - 67, 19 = CNPH - 68, 20 = CNPH - 69, 21 = CNPH - 70, 22 = CNPH - 165, 23 = CNPH - 90, 24 = CNPH - 91, 25 = CNPH - 92, 26 = CNPH - 44, 27 = CNPH - 57, 28 = CNPH - 82, 29 = CNPH - 84, 30 = CNPH - 87, 31 = CNPH - 89, 32 = CNPH - 2, 33 = CNPH - 71, 34 = CNPH - 83, 35 = CNPH - 77, 36 = CNPH - 79, 37 = CNPH - 81, 38 = CNPH - 138, 39 = CNPH - 139, 40 = CNPH - 140, 41 = CNPH - 162, 42 = CNPH - 173, 43 = CNPH - 130, 44 = CNPH - 131, 45 = CNPH - 133, 46 = CNPH - 134, 47 = CNPH - 135, 48 = CNPH - 137, 49 = CNPH - 132, 50 = CNPH - 99, 51 = CNPH - 107). Primeira e última coluna marcador molecular 1 Kb DNA Ladder.

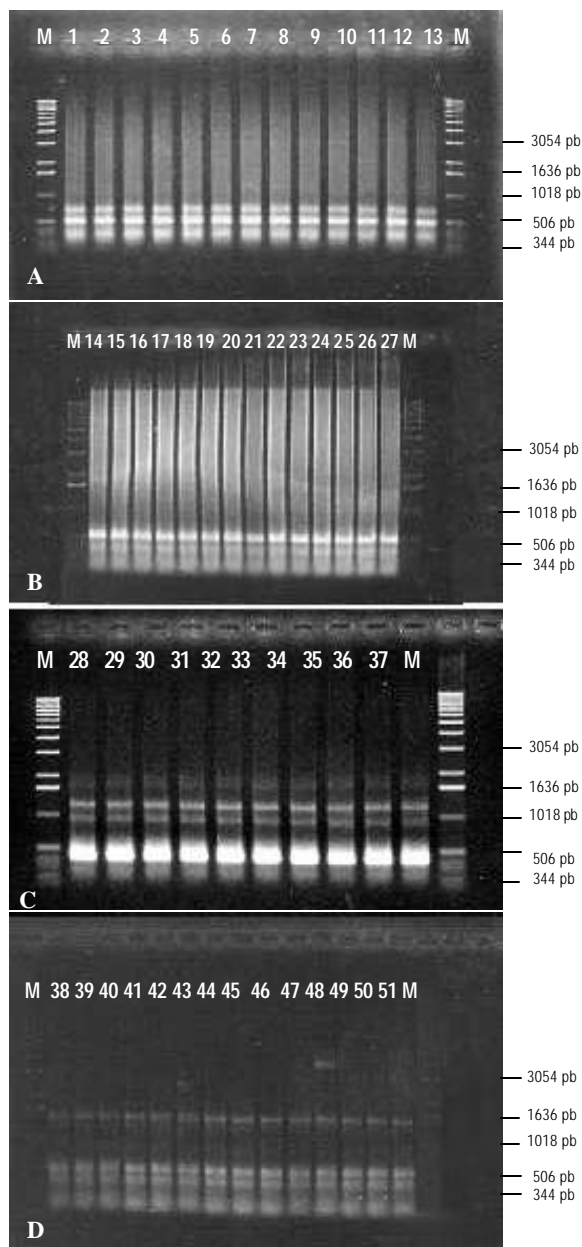


Figura 8 - Perfis eletroforéticos obtidos pela amplificação de fragmentos de DNA de isolados de *Ralstonia solanacearum* através de PCR, utilizando o iniciador REP. Os isolados estão representados da esquerda para direita (1 = CNPH - 141, 2 = CNPH - 153, 3 = CNPH - 154, 4 = CNPH - 156, 5 = CNPH - 157, 6 = CNPH - 164, 7 = CNPH - 94, 8 = CNPH - 96, 9 = CNPH - 98, 10 = CNPH - 95, 11 = CNPH - 97, 12 = CNPH - 115, 13 = CNPH - 111, 14 = CNPH - 113, 15 = CNPH - 65, 16 = CNPH - 120, 17 = CNPH - 66, 18 = CNPH - 67, 19 = CNPH - 68, 20 = CNPH - 69, 21 = CNPH - 70, 22 = CNPH - 165, 23 = CNPH - 90, 24 = CNPH - 91, 25 = CNPH - 92, 26 = CNPH - 44, 27 = CNPH - 57, 28 = CNPH - 82, 29 = CNPH - 84, 30 = CNPH - 87, 31 = CNPH - 89, 32 = CNPH - 2, 33 = CNPH - 71, 34 = CNPH - 83, 35 = CNPH - 77, 36 = CNPH - 79, 37 = CNPH - 81, 38 = CNPH - 138, 39 = CNPH - 139, 40 = CNPH - 140, 41 = CNPH - 162, 42 = CNPH - 173, 43 = CNPH - 130, 44 = CNPH - 131, 45 = CNPH - 133, 46 = CNPH - 134, 47 = CNPH - 135, 48 = CNPH - 137, 49 = CNPH - 132, 50 = CNPH - 99, 51 = CNPH - 107). Primeira e última coluna marcador molecular 1 Kb DNA Ladder.

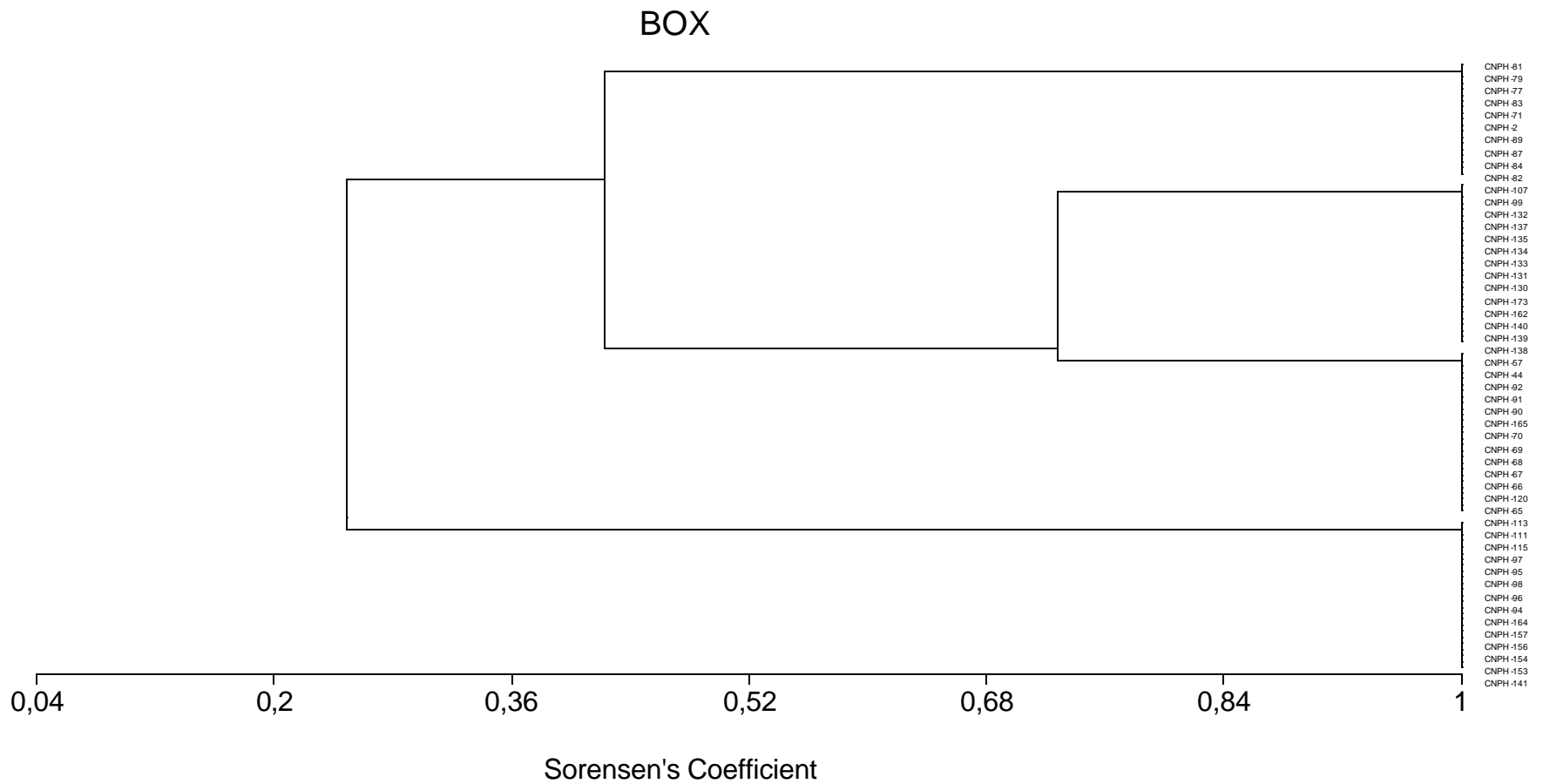


Figura 9. Dendrograma construído com base no coeficiente de similaridade obtido pelo iniciador BOX.

ERIC

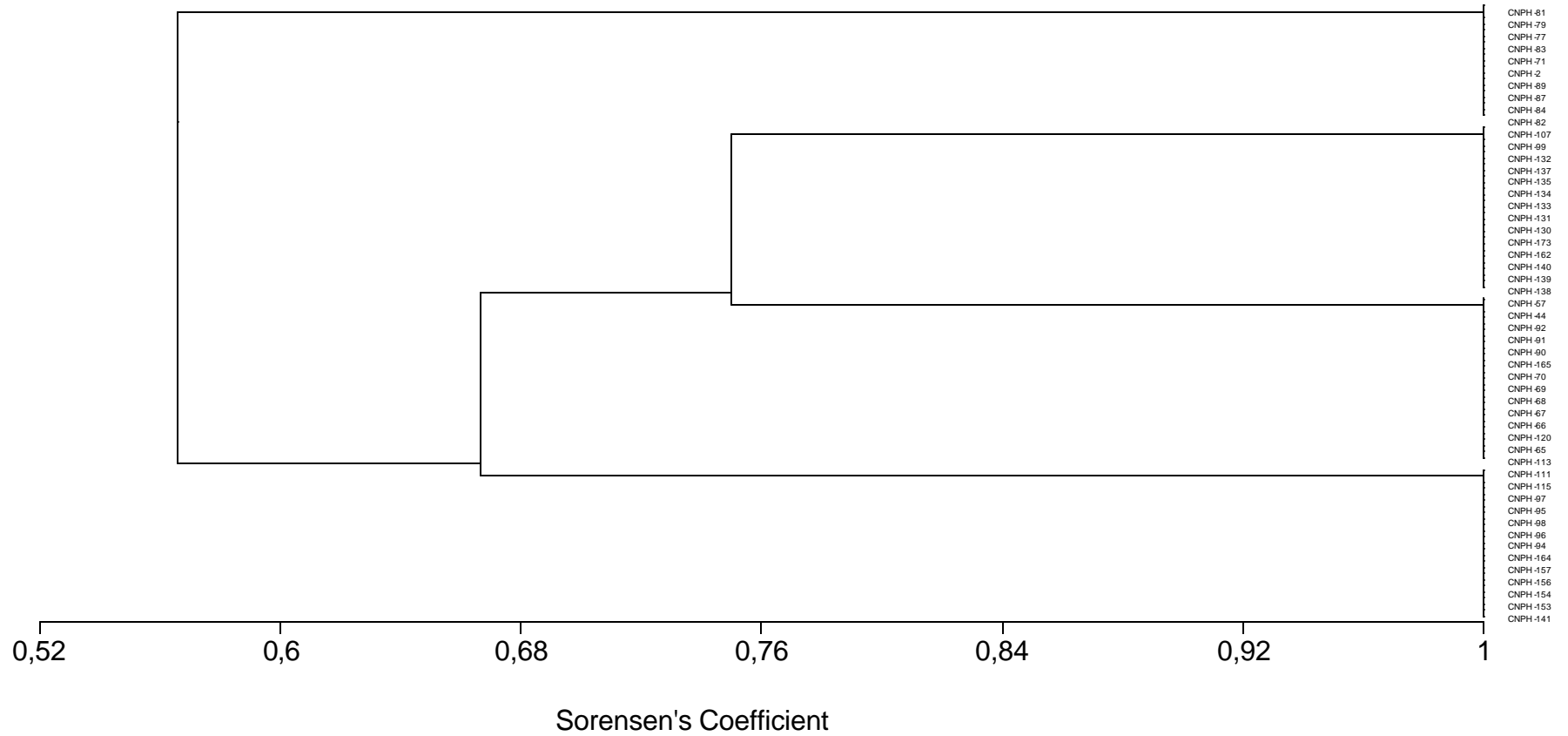


Figura 10 - Dendrograma construído com base no coeficiente de similaridade obtido pelo iniciador ERIC.

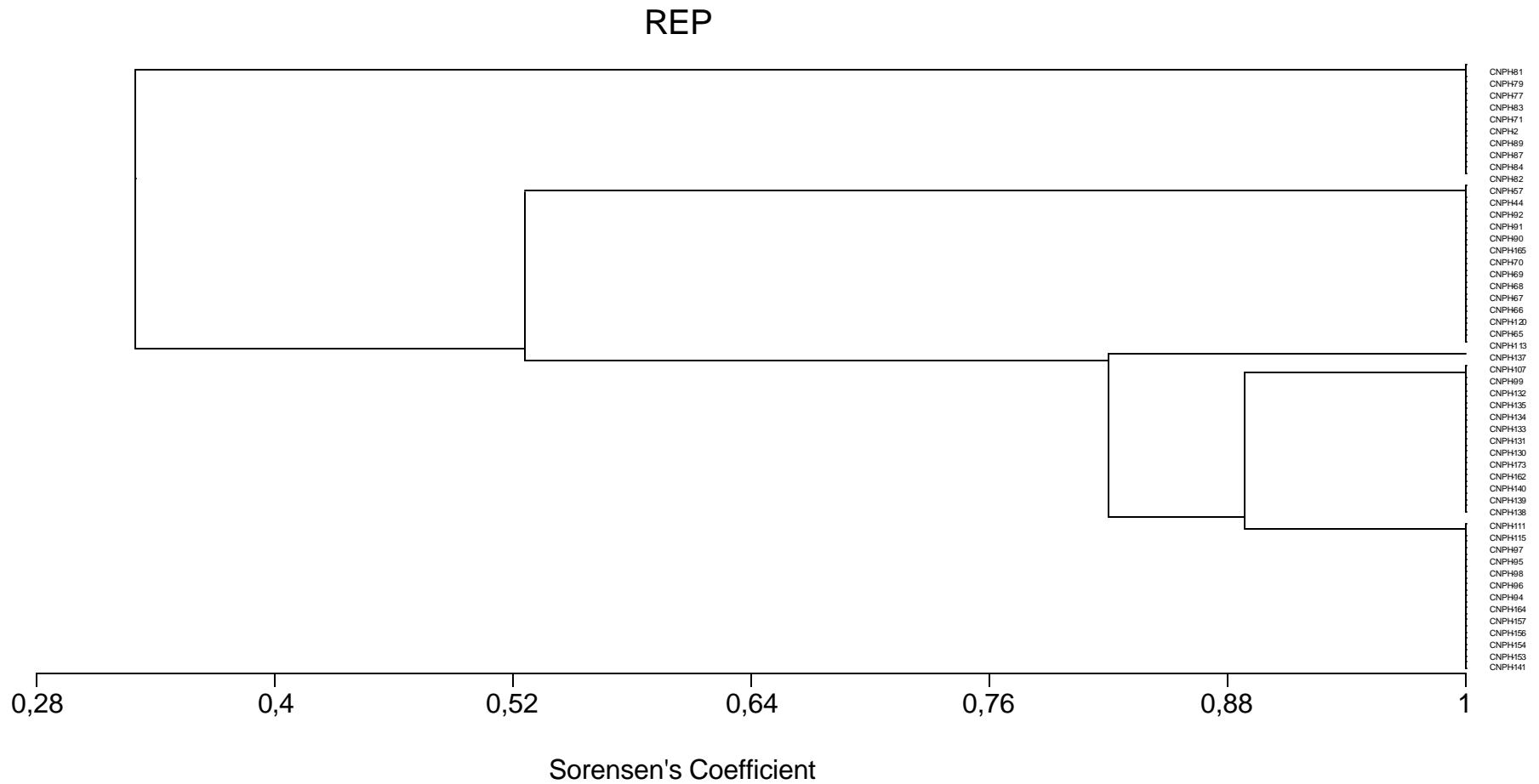


Figura 11 - Dendrograma construído com base no coeficiente de similaridade obtido pelo iniciador REP.

REP COMPOSTO

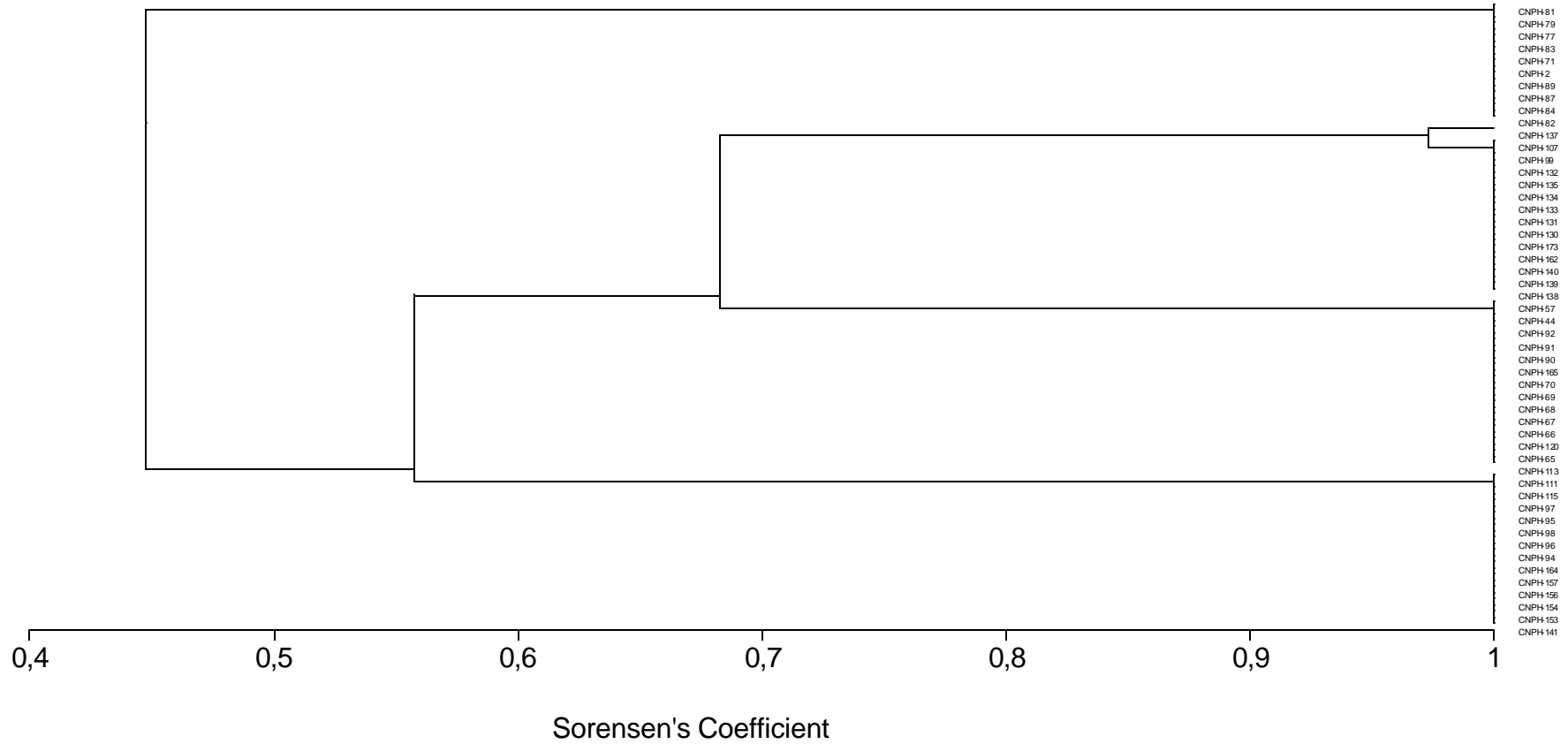


Figura 12 - Dendrograma construído com base no coeficiente de similaridade obtido pelo iniciadores BOX, REP e ERIC.

5 DISCUSSÃO

5.1 Caracterização dos isolados de *Ralstonia solanacearum* biovar 2 quanto aos aspectos morfológicos e bioquímicos

A característica tamanho de colônias permitiu segregar os isolados em três grupos distintos, de acordo com a escala utilizada na avaliação. No entanto, com base nos resultados dos demais ensaios componentes deste trabalho, ficou evidente que o tamanho da colônia parece não estar relacionado com outras características avaliadas, tais como agressividade, colonização de sistema radicular, resistência a produtos químicos, produção de melanina e ocorrência de mutantes. Assim, esta característica não se mostrou útil para a diferenciação de isolados de *R. solanacearum*, podendo ser descartada para a finalidade proposta.

Os testes de rotina para identificação de bactérias, como teste de oxidação-fermentação, utilização de asparagina como fonte única de carbono e nitrogênio, produção de pigmentação fluorescente em meio de King e coloração de grânulos de poli- β -hidroxibutirato, produziram os resultados esperados. Todos os isolados testados foram confirmados como pertencentes a espécie *R. solanacearum*.

Os nove isolados de berinjela foram capazes de utilizar trealose como única fonte de carbono, enquanto os isolados de batata utilizados não foram, confirmando a ocorrência das biovars 2-T e 2-A, respectivamente. Os resultados obtidos mostram a validade da nomenclatura proposta por

French et al. (1993) como: biovar 2-A (de Andes), que agrupa os isolados especializados em atacar batata em climas frios; e biovar 2-T (de tropical), para isolados associados a regiões de baixa altitude.

5.2 Avaliação da patogenicidade de isolados de *Ralstonia solanacearum* biovar 2 em berinjela e batata

As cultivares testadas mostraram diferenças significativas entre si, mantendo-se o padrão de resistência previamente conhecido, sem que se tenha observada quebra de resistência em relação a algum isolado. Os isolados obtidos de batata e de berinjela apresentaram o mesmo comportamento, quando inoculados nas cultivares utilizadas neste ensaio, não tendo sido possível distinguir um grupo do outro, ou seja, aparentemente não existe especificidade dos isolados em relação à hospedeira. Este tipo de comportamento pode ser justificado por se tratar de isolados pertencentes apenas à biovar 2, embora se esperasse algum tipo de diferença de virulência entre membros das biovars 2-A e 2-T.

A cultivar de batata Monalisa mostrou-se suscetível em relação à cultivar Achat, confirmando resultados encontrados por Lopes & Quezado-Soares (1994) ao estudarem a estabilidade da resistência desta cultivar à *R. solanacearum*. Para berinjela, a cultivar CNPH-110 mostrou-se mais suscetível que CNPH-175, também confirmando relatos feitos por Morgado (1991), o qual obteve resultados semelhantes ao analisar resistência de berinjela à murcha bacteriana. Praticamente todos os isolados tiveram um comportamento idêntico quanto à agressividade, quando inoculados em cultivares com diferentes níveis de resistência.

Na cultivar Monalisa foi possível diferenciar alguns isolados, com base na reação à inoculação. Apesar de diferirem entre si, estes diferentes grupos de isolados não diferiram estatisticamente dos demais isolados testados, demonstrando a grande similaridade de agressividade existente

entre os isolados pertencentes à biovar 2, aspectos observados também por Morgado et al. (1992) ao avaliarem a agressividade de isolados de *R. solanacearum* à berinjela.

O isolado CNPH-65 obtido de batata e procedente de Ibicoara-BA diferiu estatisticamente de todos os demais isolados testados. Este isolado, além de não causar doença, promoveu um desenvolvimento vegetativo diferenciado nas plantas de ambas as cultivares de batata. As plantas inoculadas com este isolado apresentaram um porte maior que as plantas testemunhas tratadas somente com água. Este fenômeno já foi anteriormente observado por Takatsu (Comunicação pessoal).

A ausência de variabilidade quanto à agressividade constatada para os 51 isolados de *R. solanacearum* é uma evidência de que a ocorrência natural de variação, quanto à esta característica dentro da biovar 2, pode ser baixa. Estes isolados são originários de regiões geográficas bastante distintas e, apesar das condições edafoclimáticas serem diversas e de a biovar 2 ser considerada específica da batata, os isolados praticamente não apresentaram variação de agressividade à batata ou à berinjela. Testes de agressividade a temperaturas mais baixas são recomendados para verificar esta mesma tendência para as duas espécies hospedeiras.

5.3 Avaliação do desenvolvimento de isolados de *R. solanacearum* biovar 2 na rizosfera de plantas de batata e berinjela, *in vitro*.

Para ambas espécies de plantas cultivadas testadas, as avaliações receberam nota máxima para todos os isolados utilizados nos testes, caracterizando que ambas podem favorecer o desenvolvimento da bactéria em sua rizosfera.

Estes resultados de colonização de plantas cultivadas *in vitro* não indicaram correlação com os resultados obtidos em ensaios em casa de vegetação. Nos ensaios de casa de vegetação, a população bacteriana foi

maior no sistema radicular de cultivares suscetíveis, porém nos ensaios *in vitro* todos os isolados comportaram da mesma forma independente das cultivares serem resistentes ou suscetíveis. Assim, o ensaio *in vitro* não se mostrou adequado para avaliar o desenvolvimento da população bacteriana no sistema radicular. Cabe salientar que *R. solanacearum* pode desenvolver intensa colonização epifítica ao redor e ao longo das raízes poucos dias após a inoculação de plantas cultivadas *in vitro*, sem causar, na maioria dos casos, danos visíveis até o quarto dia após a inoculação. Resultados semelhantes foram encontrados por Bringel et al. (2001b), quando examinaram diferentes biovars em diferentes espécies cultivadas.

Como o meio de cultura utilizado não contém carboidratos e *R. solanacearum* é uma bactéria que não exige fatores de crescimento, pode-se considerar que a colonização das raízes pela bactéria depende dos compostos orgânicos liberados pela raiz e da capacidade da bactéria em utilizar estes compostos. Fatores de crescimento liberados pelas plantas podem, no entanto, ter também efeito estimulante para o crescimento epifítico da bactéria (Bringel et al., 2001b).

Estudos visando a identificação qualitativa e quantitativa dos compostos orgânicos liberados por diferentes plantas hospedeiras, e sua utilização por diferentes estirpes de *R. solanacearum*, poderão trazer informações valiosas para o conhecimento da interação das plantas com esta bactéria, que é capaz de sobreviver epifiticamente em grande número de hospedeiras não suscetíveis.

5.4 Avaliação do desenvolvimento da população de isolados de *R. solanacearum* biovar 2 em raízes de plantas de batata e berinjela cultivadas em vasos.

O desenvolvimento populacional, medido em termos de ufc/g de raiz, foi significativamente maior nas raízes das plantas suscetíveis do que nas

raízes das plantas resistentes. No caso da Achat, a resistência desta cultivar tem sido confirmada, em relação a outras cultivares, em áreas naturalmente infestadas onde predomina a biovar 2 da bactéria (Lopes et al., 1995). Assim, os dados obtidos para desenvolvimento de população bacteriana no sistema radicular coincidem com os relatos de resistência da cultivar ao patógeno.

Os isolados obtidos de batata e de berinjela apresentaram o mesmo comportamento, quando inoculados nas cultivares utilizadas neste ensaio, não tendo sido possível distinguir um grupo do outro, ou seja, aparentemente não existe especificidade dos isolados em relação à hospedeira. Este tipo de comportamento pode ser justificado por se tratar de isolados pertencentes apenas à biovar 2. Os resultados confirmaram a cultivar de batata Monalisa como sendo mais suscetível em relação à cultivar Achat, o mesmo ocorrendo para berinjela, onde a cultivar CNPH-110 mostrou-se mais suscetível que CNPH-175. Estes resultados estão relacionados com aqueles obtidos por Morgado et al. (1992), os quais revelaram maior severidade de doença em plantas da cultivar CNPH-110, quando inoculadas na parte aérea através de ferimentos na haste. Por outro lado, estes mesmos autores obtiveram menores índices de severidade para a cultivar CNPH-175, a qual, no presente ensaio, também possibilitou menor desenvolvimento populacional de *R. solanacearum* no seu sistema radicular.

Considerando-se isoladamente cada cultivar, de batata e de berinjela, os isolados apresentaram o mesmo tipo de comportamento. Assim, os resultados mostraram que não houve diferença significativa entre os isolados, quando se avaliou o desenvolvimento da população bacteriana correspondente aos mesmos, no sistema radicular das plantas pertencentes a uma mesma cultivar. Esta ausência de variação entre isolados pode ser atribuída ao fato de todos os isolados serem pertencentes à biovar 2 e, portanto, apresentarem similaridade genética entre si.

Os resultados também revelaram que os isolados obtidos de batata não distinguiram daqueles obtidos de berinjela, com relação ao desenvolvimento da população bacteriana nas raízes das variedades de batata e de berinjela testadas. Isto demonstrou uma ausência de especialização entre o patógeno e o hospedeiro, mostrando que o patógeno não foi favorecido, em termos de colonização de raiz, pela espécie hospedeira a partir da qual ele foi isolado. Este tipo de comportamento pode ser justificado por se tratar de isolados pertencentes apenas à biovar 2, embora se esperasse algum tipo de diferença quanto ao comportamento dos fenótipos A e T. Assim, apesar de serem distintos bioquimicamente quanto à utilização da trealose, estas variantes não se distinguiram entre si quanto à especialização em relação ao hospedeiro.

Avaliações como estas, feitas em batata e berinjela, também foram realizadas para outras espécies vegetais cultivadas (Morgado et al., 1992; Viana, 1995; Melo et al., 1999c; Bringel et al., 2001a). Os dados obtidos sob condições de casa de vegetação somente poderão ser considerados definitivamente válidos após a comprovação em condições de campo. Esta comprovação poderá ser buscada gradativamente, em diferentes áreas e regiões, quando for possível executar ensaios em solos naturalmente infestados, pois não se pode criar campos experimentais abertos infestados com isolados e biovars obtidos de diferentes regiões (Lopes & Takatsu, 1997). Informações desta natureza poderão contribuir para a escolha de espécies ou de cultivares mais adequadas para fins de controle da doença, através de rotação de cultura.

Como a comprovação nas condições naturais de campo é baseada na manifestação da doença, a avaliação não pode ser feita com a mesma variedade ou espécie indicadora, mas sim com a variedade ou espécie suscetível compatível com o isolado do patógeno presente na área infestada, o que dificulta muito a comparação dos dados obtidos em diferentes ensaios. Além deste problema, fatores como temperatura,

textura do solo, regime de chuva, composição microbiana do solo e muitos outros interferem marcadamente na manifestação da doença o que dificulta ainda mais a comparação dos dados, mesmo repetindo-se os ensaios por vários anos consecutivos (Melo et al., 1999a).

O desenvolvimento da população do patógeno, portanto, foi desfavorecido no sistema radicular das cultivares resistentes de batata e berinjela, quando comparado com cultivares suscetíveis. Tomando-se por base estes resultados, pode-se inferir que o uso de cultivares resistentes poderá contribuir para a redução do inóculo presente no solo, o que poderá refletir em menores níveis de doença e conseqüentemente maior rendimento da produção. Um ensaio mais amplo, abrangendo maior número de cultivares, poderá confirmar os resultados obtidos neste trabalho e gerar informações para um controle mais adequado da doença, através do emprego de rotação de culturas.

Assim sendo, o aperfeiçoamento de métodos de avaliação da colonização e da flutuação populacional de *R. solanacearum* em raízes de plantas sob condições de casa de vegetação é fundamental para a grande maioria dos ensaios necessários para a obtenção de informações sobre a sobrevivência de diferentes isolados de *R. solanacearum* em diferentes espécies e variedades de plantas.

5.5 Análise de seqüências repetitivas de DNA amplificadas com os iniciadores ERIC, BOX e REP (rep-PCR)

A utilização de rep-PCR para caracterizar isolados de *R. solanacearum* permitiram segregar os mesmos em quatro grupos distintos de padrões de bandas para os iniciadores BOX e ERIC, e cinco para o iniciador REP. No entanto, com base nos resultados dos demais ensaios componentes deste trabalho, ficou demonstrado que o tamanho das colônias, a ocorrência de mutantes, a produção de melanina, a capacidade

de colonização do sistema radicular e a resistência a antibióticos e fungicidas não mostraram correlação com os dados moleculares.

Quanto à característica bioquímica, os isolados, caracterizados como 2-A, e os de berinjela, caracterizados como 2-T, em relação à utilização de trealose, apesar de não serem distintos em termos de especialização em relação ao hospedeiro e em termos de agressividade, foram reunidos em grupos distintos através de rep-PCR. Neste caso, a separação dos dois grupos com base na característica bioquímica foi confirmada pela análise molecular conduzida com os iniciadores ERIC, BOX e REP, a qual permitiu reunir todos os isolados de berinjela num único grupo.

Os isolados de batata e berinjela não diferiram quanto à agressividade, porém, com a utilização dos iniciadores, foi possível estabelecer grupos distintos para os isolados, inclusive um grupo específico composto por isolados de berinjela. Portanto, também foi demonstrada uma ausência de relação entre variabilidade genética detectada pelos iniciadores com a patogenicidade. Cook & Sequeira (1994) identificaram 33 grupos com base na técnica molecular de RFLP. Neste caso, a origem geográfica dos isolados foi a característica mais correlacionada com as análises de RFLP, as quais evidenciaram duas divisões geneticamente distintas, uma da Austrália (biovars 3, 4 e 5), e outra das Américas (1, 2 e 2T).

A tentativa de se associar grupos de isolados caracterizados molecularmente com os locais de origem destes isolados revelou alguns aspectos interessantes. No grupo III, que abriga todos os isolados de berinjela e apenas um isolado de batata, todos os isolados são originários de uma mesma área geográfica, ou seja, do Distrito Federal. No grupo II, encontram-se todos os isolados provenientes de Ibicoara-BA, porém cinco isolados do Distrito Federal e dois do Paraná (Mariental e Lapa) também fazem parte deste grupo. No grupo I, estão reunidos somente isolados do Paraná, sendo cinco deles de Piraí do Sul, um de Contenda, um da Lapa e

um de Guarapuava. O grupo IV, de forma semelhante ao grupo II, congrega isolados originários de locais bastante diversos. Neste grupo são encontrados isolados do Paraná (Araucária, Contenda, Lapa, Guarapuava e Piraí do Sul), de Goiás (Cristalina), do Rio Grande do Sul (André da Rocha e Novo Prata) e do Distrito Federal. Portanto, nos grupos I e III parece haver uma correlação entre os grupos gerados por rep-PCR e o local de origem dos isolados.

Smith et al. (1995) encontraram variabilidade genética entre isolados de *R. solanacearum* originários do Quênia, usando iniciadores BOX e ERIC. Da mesma forma que neste trabalho, os isolados foram reunidos em grupos e para alguns destes grupos houve uma correlação entre grupos de rep-PCR e distribuição microgeográfica. Resultados semelhantes foram encontrados por Vera Cruz et al. (1996) ao estudarem variação de haplótipos de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* através de rep-PCR e análises de RFLP, associando a distribuição microgeográfica do patógeno no campo. Cook et al. (1989) demonstraram através de análise de RFLP que isolados de *R. solanacearum* biovar 2 eram extremamente conservados ao nível de DNA, porém alguns isolados encontrados em terras baixas da Amazônia (N₂) apresentavam-se metabolicamente mais versáteis do que os isolados biovar 2 encontrados nas terras altas dos Andes.

A presença de um mesmo padrão de bandas encontrado em mais de uma região geográfica ou a mesma região geográfica apresentar vários padrões de bandas pode ser justificada pelo fato de que grande parte do material propagativo (batata-semente) pode ser transportada de uma região contaminada para uma ainda não infestada. Não se destaca, entretanto, a possibilidade de sua ocorrência em plantas nativas, as quais podem contribuir para a manutenção da bactéria em áreas nativas.

A diversidade genética de isolados de *R. solanacearum* biovar 2 pode ser considerada normal quando comparada com estudos realizados com diversas espécies bacterianas, como, por exemplo, *Xanthomonas*

axonopodis pv. *manihotis* (Restrepo et al., 2000) e *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Bouzar et al., 1999; Hwang et al., 1995), nas quais foi possível distinguir quatro grupos por rep-PCR. Para *Clavibacter michiganensis*, a técnica distinguiu 5 grupos (Louws et al., 1998) e para *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* foram encontrados apenas 7 haplótipos combinados (Vera Cruz et al., 1996).

A significativa variabilidade genética encontrada na população de *R. solanacearum* biovar 2 pode estar relacionada com aspectos epidemiológicos diferenciados existentes entre as diferentes regiões estudadas. No entanto, essa afirmação só poderá ser confirmada através de estudos da interação planta-patógeno em condições de ambiente controlado para que as demais variáveis envolvidas na epidemiologia da doença, como as condições edafoclimáticas, possam ser eliminadas.

Um conhecimento mais adequado do genótipo deste patógeno pode evidenciar a necessidade de tratá-lo como uma variável epidemiológica a ser considerada quando do estudo da dinâmica da doença em campo e contribuir para o entendimento da evolução desse organismo e de possíveis interações entre seus diferentes isolados e entre seus hospedeiros.

Os dados moleculares obtidos confirmaram a separação dos isolados de batata e berinjela ao nível subespecífico. Iniciadores específicos baseados em seqüências repetitivas ERIC, REP ou BOX têm sido utilizados para detecção de *R. solanacearum* e para diferentes patógenos (Lemos et al., 1999; Travensolo, 2000; Wendland, 2000). Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que a população natural da bactéria em batata e berinjela apresenta considerável divergência genética e, portanto, a escolha do fragmento de DNA a ser utilizado para a obtenção de iniciadores específicos deve ser bastante criteriosa.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitiram as seguintes conclusões:

1 - Não houve indicação de correlação entre os grupos de isolados determinados através de análise molecular através de rep-PCR com as demais características dos isolados tais como tamanho da colônia, ocorrência de mutantes, produção de melanina, capacidade de colonização de raízes e resistência a produtos químicos.

2 - A caracterização dos biovares 2 A e 2T feita com base no uso ou não de trealose foi confirmada pelo uso de análise molecular com os iniciadores ERIC, BOX e REP.

3 - Os testes *in vitro* não se mostraram adequados para avaliar o desenvolvimento da população bacteriana dos diferentes isolados nas raízes de plantas de batata e berinjela.

4 - Em condições de casa de vegetação, a população bacteriana dos diversos isolados testados se desenvolveu melhor no sistema radicular de variedades suscetíveis de batata e berinjela.

5 - O teste de agressividade objetivando a diferenciação dos isolados de *Ralstonia solanacearum* biovar II não se caracterizou como um parâmetro adequado para diferenciação dos isolados em grupos.

6 - A avaliação do desenvolvimento da população de isolados de *Ralstonia solanacearum* biovar 2 em raízes de plantas de batata e berinjela cultivadas em vasos confirmou os padrões de resistência e suscetibilidade.

7 - A análise de seqüências repetitivas de DNA amplificadas com os iniciadores ERIC, BOX e REP (rep-PCR) mostrou que *Ralstonia solanacearum* biovar 2 presente em batata e berinjela, em cinco regiões geográficas diferentes, apresentou quatro grupos distintos de padrões de bandas para os iniciadores BOX e ERIC, e cinco para o iniciador REP.

8 - Os isolados de berinjela analisados molecularmente neste estudo, com iniciadores BOX, ERIC e REP apresentaram um único padrão de bandas, sendo assim agrupados em um único grupo

9 - A técnica de rep-PCR, baseada na amplificação de seqüências conservadoras e repetitivas no DNA genômico de *Ralstonia solanacearum* biovar 2 com os iniciadores ERIC, REP e BOX mostrou ser uma ferramenta rápida, eficaz e altamente reproduzível para estudos envolvendo um grande número de isolados e obtenção de dados confiáveis em nível representativo da população natural da bactéria.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 4. ed. San Diego: Academic Press, 1997. 635p.

AKIEW, E. B.; TREVORROW, P. R. Management of bacterial wilt of tobacco. In: HAYWARD, A. C.; HARTMAN, G. L. (Ed.) **Bacterial wilt: the disease and the causative agent, *Pseudomonas solanacearum***. Willingford: CAB International, 1994. p. 179-198.

ALLEN, C.; SIMON, L.; ATKINSON, M.; SEQUEIRA, L. Analysis of polygalacturonase as a component of bacterial wilt disease. In: INTERNATIONAL BACTERIAL WILT SYMPOSIUM, Kaoshiung, 1992. **Proceedings**. Kaoshiung: ACIAR, 1992. p.283-284.

ANURATHA, C. S.; GNANAMANICKAM, S. S. Biological control of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum* in India with antagonistic bacteria. **Plant and Soil**, v.124, p.109-116, 1990.

- BLACK, R.; HOLT, J.; SWEETMORE, S. **Bacteriological identification system for resource-poor plant pathology laboratories**. Chatham: Natural Resources Institute, 1996. 31p.
- BOUZAR, H.; JONES, J. B.; STALL, R. E.; LOUWS, F. J.; SCHNEIDER, M.; RADEMAKER, J. L. W.; DE BRUIJN, F. J.; JACKSON, L. E. Multiphasic analysis of *Xanthomonas* causing Bacterial spot disease on tomato and pepper in the Caribbean and Central America: Evidence for common lineages within and between countries. **Phytopathology**, v.89, p.328-335, 1999.
- BRINGEL, J. M. M. Colonização de raízes de plantas cultivadas por *Pseudomonas solanacearum* biovars I, II e III em condições de casa de vegetação e "in vitro". Brasília, 1997. 119p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília.
- BRINGEL, J. M. M.; TAKATSU, A.; UESUGUI, C. H. Colonização radicular de plantas cultivadas por *Ralstonia solanacearum* biovars 1, 2 e 3. **Scientia Agricola**, v. 58, n. 3, p. 497-500, 2001a.
- BRINGEL, J. M. M.; UESUGUI, C. H.; TAKATSU, A. Colonização *in vitro* de raízes de plantas cultivadas por *Ralstonia solanacearum* biovars 1, 2 e 3. **Pesquisa em Foco**, v. 9, n.13, p. 12-15, 2001b.
- COOK, D. SEQUEIRA; J. Strain differentiation of *Pseudomonas solanacearum* by molecular genetic methods. In: HAYWARD, A. C.; HARTMAN, G. L. (Ed.). **Bacterial wilt: the disease and the causative agent, *Pseudomonas solanacearum***. Willingford: CAB International, 1994. p.77-93.

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 and Microbe Interactions**, v.2, p.113-121, 1989.

COPLIN, D. L.; COOK, D. Molecular genetics of extracellular polysaccharide biosynthesis in vascular phytopathogenic bacteria. **Molecular Plant and Microbe Interactions**, v.3, p.293-300, 1990.

De BRUIJN, F. J. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterbacterial repetitive intergenic consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacterial. **Applied Environmental Microbiology**, v. 58, p.2180-2187, 1992.

DENNY, T. P.; BRUMBLEY, S. M.; CARNEY, B. F.; CLOUGH, S. J.; SCHELL, M. A. Phenotype consersion of *Pseudomonas solanacearum*. In: INTERNATIONAL BACTERIAL WILT SYMPOSIUM, Kaoshiung, 1994. **Proceedings**. Kaoshiung: ACIAR, 1994. p.252-256.

- DRISTIG, M. C. G.; DIANESE, J. C. Characterization of *Pseudomonas solanacearum* biovars based on membrane protein patterns. **Phytopathology**, v.80, p.641-646, 1990.
- EDEN-GREEN, S. J. Diversity of *Pseudomonas solanacearum* and related bacterial in South East Asia: new directions for “Moko” disease. In: HAYWARD, A. C.; HARTMAN, G. L. (Ed.). **Bacterial wilt: the disease and the causative agent, *Pseudomonas solanacearum***. Wallingford: CAB International, 1994. p.25-34.
- ENGELBRECHT, M. C.; HATTING, M. J. Numerical analysis of phenotypic features of *Pseudomonas solanacearum* isolated from tobacco and other hosts in South Africa. **Plant Disease**, v.73, p.893-898, 1989.
- FENG, J.; ZHANG, M.; BAI, X.; HAN, B.; LIU, T.; FAN, M.; TANG, J. M. A. Q. One specific DNA piece in *Pseudomonas solanacearum* affecting *Arachis hypogaea*. In: INTERNATIONAL BACTERIAL WILT SYMPOSIUM, Kaoshiung, 1992. **Proceedings**. Kaoshiung: ACIAR, 1992. p.245-251.
- FERREIRA, L. P.; SALGADO, C. L. Bactérias. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Ceres, 1995. v.1: Princípios e conceitos, p.97-130.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA CENARGEN, 1998. 220 p.

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

FRENCH, E.R.; ALEY, P.; TORRES, E.; NYDEGGER, U. Diversity of *Pseudomonas solanacearum* in Peru and Brazil. In: INTERNATIONAL BACTERIAL WILT SYMPOSIUM, Kaoshiung, 1993. **Proceedings**. Kaoshiung: ACIAR, 1993. p.70-77.

FRENCH, E. R.; ALEY, P.; TORRES, E.; NYDEGGER, U. Diversity of *Pseudomonas solanacearum* in Peru and Brazil. In: INTERNATIONAL BACTERIAL WILT SYMPOSIUM, Kaoshiung, 1993. **Proceedings**. Kaoshiung: ACIAR, 1993. p. 79-81.

FURUYA, N.; KUSHIMA, Y.; TSUCHIYA, K.; MATSUYAMA, N.; WAKIMOTO, S. Protection of tomato seedlings by pre-treatment with *Pseudomonas glumae* from infection with *Pseudomonas solanacearum* and its mechanisms. **Annals of Phytopathology Society of Japan**, v.57, p.363-370, 1991.

- GAMA, M. I. C. S. Identificação de plantas transgênicas por PCR. In: BRASILEIRO, A. M. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. C (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa Cenargen, 1998. p.179-189.
- GILLINGS, M R.; FAHY, P. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum* biovar II and N2 assessed using restriction endonuclease analysis of total genomic DNA. **Plant Pathology**, v.42, p.744-753, 1993.
- GILLINGS, M. R.; FAHY, P. Genomic fingerprinting: Toward a unified view of the *Pseudomonas solanacearum* species complex. In: HAYWARD, A.C.; HARTMAN, G. L. (Ed.). **Bacterial wilt: the disease and the causative agent, *Pseudomonas solanacearum***. Willingford, CAB International, 1994. p.95-112.
- GILSON, E.; CLEMENTE, J. M.; BRUTLAG, D.; HOFNUNG, M. A family of dispersed repetitive extragenic palindromic DNA sequences in *E. coli*. **EMBO Journal**, v.3, p.1417-1421, 1984.
- GILSON, E.; PERRIN, D.; HOFNUNG, M. DNA polymerase I and a protein complex bind specifically to *E. coli* palindromic unit highly repetitive DNA: implications for bacterial chromosome organization. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 3941-3952. 1990.

- GISELLE, N.; LINDSTROM, K. Use of repetitive DNA sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomic DNA of *Rhizobium galegae* strains and to identify the DNA obtained from sonicating the liquid cultures and root nodules. **Systematic and Applied Microbiology**, v.17, p.265-273, 1994.
- GLICK, R. B. The enhancement of plant growth by free-living bacterial. **Canadian Journal of Microbiology**, v.41, p.109-117. 1995.
- GOTO, M. **Fundamentals of bacterial plant pathology**. San Diego: Academic Press, 1992. 342p.
- GRAVES, L. M.; SWAMINATHAN, M. Universal bacterial DNA isolation procedure. In: PERSING, D. H.; SMITH, T. F.; TENOVER, F. C.; WHITE, B. E. (Ed.). **Diagnostic molecular microbiology: principles and applications**. Washington, American Society for Microbiology, 1993. p. 325-328.
- GRIMAULT, V.; ANAIA, G.; PRIOR, P. Distribution of *Pseudomonas solanacearum* in the stem tissues of tomato plants with different levels of resistance to bacterial wilt. **Plant Pathology**, v.43, p.663-668, 1994.
- HAYWARD, A. C. Characteristic of *Pseudomonas solanacearum*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 27, p.265-277, 1964.
- HAYWARD, A. C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Annual Review of Phytopathology**, v.29, p.65-87, 1991.

- HAYWARD, A. C. The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. In: HAYWARD, A. C; HARTMAN, G. L. (Ed). **Bacterial wilt**: the disease and the causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. Willingford: CAB International, 1994. p.9-24.
- HUANG, J.; DENNY, T. P.; SCHELL, M. A. VrsB, a regulator of virulence genes of *Pseudomonas solanacearum*, is homologous to sensors of the two-component regulator family. **Journal of Bacteriology**, v.175, p.6169-6179, 1993.
- HULTON, C. S.; HIGGINS, C. F.; SHARP, P. M. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in genome of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other Enterobacteria. **Molecular Microbiology**, v.5, p. 825-834, 1991.
- HWANG, B. K.; LEE, J. T.; HWANG, B. G.; KOH, Y. J. Restriction length polymorphism analysis of the plasmids DNAs in strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from different geographic areas. **Journal of Phytopathology**, v.143, p. 185-191. 1995.
- JAUNET, T.; WANG, J. F. Populations structure of *Ralstonia solanacearum* in a disease nursery and tomato production in the field in Taiwan. In: INTERNATIONAL BACTERIAL WILT SIMPOSIUM, Guadeloupe, 1997. **Proceedings**. Guadeloupe: ACIAR, 1997. p.22-27.

- KADO, C. L.; HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.60, p.969-976, 1970.
- KELMAN, A. The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*: a literature review and bibliography. **Agriculture of Experimental Station**, v. 2, p.194, 1953.
- KELMAN, A.; SEQUEIRA, L. Root-to-root spread of *Pseudomonas solanacearum*. **Phytopathology**, v.55, 304-309.1965.
- KELMAN, A.; HARTMAN, G. L.; HAYWARD, D. C. Introduction. In: HAYWARD, A. C; HARTMAN, G. L. (Ed). **Bacterial wilt**: the disease and the causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. Willingford: CAB International, 1994. p.1-7.
- LEMOS, E. G. M.; CIAPINA, L. P.; KISHI, L. T.; ALVES, L. M. C. Avaliação da eficiência dos diferentes primers específicos no diagnóstico da clorose variegada dos citros. **Summa Phytopathologica**, v.25, p.41, 1999.
- LOPES, C. A. Doenças bacterianas da batata. **Informe Agropecuário**, v.7, p.40-42, 1981.
- LOPES, C. A. Ecologia de *Pseudomonas solanacearum*. In: TALLER SOBRE ENFERMIDADES BACTERIANAS DELA PAPA, 1., Brasília, 1994. Brasília:EMBRAPA CNPH CIP, 1994a. p.17-22.

- LOPES, C. A. Situação da murcha bacteriana no Brasil. In: TALLER SOBRE ENFERMIDADES BACTERIANAS DELA PAPA, 1., Brasília, 1994. Brasília: EMBRAPA CNPH CIP, 1994b. p.13-16.
- LOPES, C. A.; QUEZADO-SOARES, A. M. Evidence of the stability of the resistance of the potato cultivar Achat to bacterial wilt in Brazil. **Bacterial Wilt Newsletter**, v.11, p.6-7, 1994.
- LOPES, C. A.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. Manejo integrado das doenças da batata. **Informe Agropecuário**, v. 20, p. 56-60, 1999.
- LOPES, C. A.; TAKATSU, A. Controle da murcha bacteriana. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, p.224-225. 1997.
- LOUWS, F. J.; RADEMAKER, J. L. W.; DE BRUIJN, F. J. The three of PCR-based genomic analysis of phytopathogenic bacteria: Diversity, detection, and disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, v.89, p.81-114, 1999.
- LOUWS, F. J.; FULBRIGHT, D. W.; STEPHENS, C. T.; DE BRUJN, F. J. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. **Applied Environmental Microbiology**, v.60, p.2286-2295, 1994.
- LOUWS, F. J.; FULBRIGHT, D. W.; STEPHENS, C. T.; DE BRUJN, F. J. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprint to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Phytopathology**, v.85, p.528-536, 1995.

LOUWS, F. J.; BELL, J.; MEDINA-RORA, C. M.; SMART, C. D.; OPGENORTH, D.; ISHIMARU, C. A.; HAUSBECK, M. K.; DE BRUIJN, F. J.; FULBRIGHT, D. W. rep-PCR-Mediated genomic fingerprint: a rapid and effective method to identify *Clavibacter michiganensis*. **Phytopathology**, v.88, p.862-868, 1998.

MARIANO, R. L. R. (coord.) **Manual de práticas em fitobacteriologia**. Recife: o autor, 2000. 171p.

MARTIN, B.; HUMBERT, O.; CAMARA, M.; GUENZI, E.; WALKER, J.; MITCHEL, T.; ANDREW, P.; PRUDHOMME, M.; ALLOING, G.; HAKENBECK, R.; MORRISON, D. A.; BOULNOIS, G. J.; CLAVERYS, J.P. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. **Nucleic Acids Research**, v.20, p. 3479-3483, 1992.

MARTINS, O. M. **Polymerase chain reaction in the diagnosis of bacterial wilt, caused by *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.** Cruvillier: Verlag Göttingen, 2000. 126 p.

McLAUGHLIN, R. J.; SEQUEIRA, L.; WEINGARTNER, D. P. Biocontrol of bacterial wilt of potato with an avirulent strains of *Pseudomonas solanacearum*: interaction with root-knot nematodes. **American Potato Journal**, v. 67, p.93-107, 1990.

- MELO, S. M; TAKATSU, A.; UESUGUI, C. H.; FURUYA, N.; MATSUYAMA, N. Population dynamics of *Ralstonia solanacearum* isolates in root systems of various crops. **Bulletim of the Institute of Tropical Agriculture**, v. 22, p. 45-50, 1999a.
- MELO, S. M; TAKATSU, A.; UESUGUI, C. H.; FURUYA, N.; MATSUYAMA, N. Comparative membrane protein characterization of brazilian strains of *Ralstonia solanacearum*. **Bulletim of the Institute of Tropical Agriculture**, v. 22, p.45-50, 1999b.
- MELO, S. M; TAKATSU, A.; UESUGUI, C. H.; FURUYA, N.; MATSUYAMA, N. Comparative studies on fatty acid composition of the whole-cell and outer membrane in brasilian strains of *Ralstonia solanacearum*. **Journal of Faculty of Agricultural Kyushu University**, v.44, n.1/2, p.17-23, 1999c.
- MELTON, T.; POWELL, N.T. Effects of two-year crop rotations and cultivar resistance on bacterial wilt in flue-cured tobacco. **Plant Disease**, v.75, p. 695-698, 1991.
- MICHEL, V.; HARTMAN, G. L.; MIDMORE, D. J. Effect of previous crop on soil population of *Burkholderia solanacearum*, bacterial wilt, and yield of tomatoes in Taiwan. **Plant Disease**, v.80, p.1367-1372, 1996.
- MIRANDA, E. F. O. Colonização de raízes de plantas daninhas por *Ralstonia solanacearum* *in vitro* e em casa de vegetação. Brasília, 1997. 114 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília.

- MORGADO, H. S. Resistência de berinjela (*Solanum melongena* L.) à murcha bacteriana causada por *Pseudomonas solanacearum* E. F. Smith. Brasília, 1991. 88p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília.
- MORGADO, H. S.; LOPES, C. A.; TAKATSU, A. Virulência de isolados de *Pseudomonas solanacearum* à berinjela. **Fitopatologia Brasileira**, v.17, n.4, p.430-434, 1992.
- MORGADO, H. S.; LOPES, C. A.; TAKATSU, A. Métodos para avaliação de resistência à murcha bacteriana em berinjela. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.29, n.2, p.237-245, 1994.
- MULLIS, K. B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Scientific American**, v.2, p.56-65, 1990.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiological Plant**, v.15, p.473-497, 1962.
- NIELSON, L. W.; HAYNES, F. L. Resistance in *Solanum tuberosum* to *Pseudomonas solanacearum*. **American Potato Journal**, v.37, p.260-267, 1960.
- PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1996. 524p.

- RAMESH, C. R.; BANDIOPADHYAY, A. K. Bacterial wilt of tomato on Andaman and Nicobar Island. In: INTERNATIONAL BACTERIAL WILT SYMPOSIUM, Kaoshiung, 1992. **Proceedings**. Kaoshiung: ACIAR, 1992. p.31.
- RASMUSSEN, U.; SVENNING, M. M. Fingerprinting of *Cyanobacteria* based on PCR with primers derived from short and long tandemly repeated repetitive sequences. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.1, p.265-272, 1998.
- RESTREPO, S.; VÉLEZ, C. M.; VERDIER, V. Measuring the genetic diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* within different fields in Colombia. **Phytopathology**, v.90, p.683-690, 2000.
- SEAL, S. E.; ELPHINSTONE, J.G. Advances in identification and Detection of *Pseudomonas solanacearum*. In: HAYWARD, A.C.; HARTMAN, G. L. (Ed.). **Bacterial wilt: the disease and the causative agent, *Pseudomonas solanacearum***. Willingford: CAB International, 1994. p.35-37.
- SEAL, S. E.; JACKSON, L. A.; DANIELS, M. J. Use of tRNA consensus primers to indicate subgroups of *Pseudomonas solanacearum* by polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, v.5, p.3759-3761, 1992.
- SMITH, J. J.; OFFORD, L. C.; HOLDRNESS, M.; SADDLER, G.S.. Pulsedfield gel eletrophoresis analysis of *Pseudomonas solanacearum*. **European Plant Protection Organization Bulletin**, v. 25, p.163-167,1995.

- TAKATSU, A.; LOPES, C. A. Murcha-bacteriana em hortaliças: avanços científicos e perspectivas de controle. **Horticultura Brasileira**, v.15, p.170-177, 1997.
- TRAVENSOLO, R. F. Marcador scar para *Xylella fastidiosa* em videira. Jaboticabal, 2000. 116p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
- TUSSIME, G.; ADIPALA, E.; OPIO, F.; BHAGSARI, A. S. Weeds as latent host of *Ralstonia solanacearum* in highland Uganda: Implications for lowland potato bacterial wilt control. In: INTERNATIONAL BACTERIAL WILT SIMPOSIUM, Guadaloupe, 1997. **Proceedings**. Guadaloupe: ACIAR, 1997. p.87.
- VERA CRUZ, C. M.; ARDALES, E. Y.; SKINNER, D. Z.; TALAG, J.; NELSON, R. J.; LOUWS, F. J.; LEUNG, H.; MEW, T. W.; LEACH, J. E. Measurement of haplotypic variation in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* within a single field by rep-PCR and RFLP analysis. **Phytopathology**, v. 86, p.1352-1359, 1996.
- VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in Eubacteria and application to fingerprint of bacterial genomic. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n.24, p. 6823-6831, 1991.

- VIANA, E. C. G. M. Estudos da sobrevivência de um isolado variante de *Pseudomonas solanacearum* em raízes de plantas cultivadas. Brasília, 1995. 61 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília.
- WAKIMOTO, S.; UTATSU, K.; MATSUO, N.; HAYASHI, N. Multiplication of *Pseudomonas solanacearum* in pure water. **Annals of Phytopathology Society of Japan**, v. 48, p.620-627, 1982.
- WENDLAND, A. Diversidade genética de *Xylella fastidiosa* em três regiões produtoras de citros (*Citrus sinensis*) do Estado de São Paulo. Piracicaba, 2000. 74p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luíz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- WULLINGS, B. A.; VAN BEUNINGEN, A. R.; JANSE, J. D.; AKKERMANS, A. D. L. Detection of *Ralstonia solanacearum*, which causes brown rot of potato, by fluorescent in situ hybridization with 23S rRNA-Targeted probes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.11, p.4546-4554, 1998.
- YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; OYAIZU, H.; YANO, I. HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T.; ARAKAWA, M. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, wilt the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni nad Holmes 1981) comb. nov. **Microbiological Immunology**, v. 36, p. 1251-1275, 1992.

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. **Microbiological Immunology**, v. 39, p.897-904, 1995.

YANG, C. H.; HO, G. D. Resistance and susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. **Phytopathology**, v.88, n.4, p.330-334, 1998.