

Diversidade Patogênica e Molecular de *Ralstonia solanacearum* da Região Amazônica Brasileira

Samara B. Costa¹, Marisa A.S.V. Ferreira¹ & Carlos A. Lopes²

¹Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília, CEP 70910-900, Brasília, DF, Brasil, e-mail: marisavf@unb.br;

²Embrapa Hortaliças, Cx. Postal 218, CEP 70359-970, Brasília, DF, Brasil

Autor para correspondência: Marisa A.S.V. Ferreira

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

RESUMO

Foi avaliada a diversidade de isolados de *Ralstonia solanacearum* obtidos de tomateiro e de outras hospedeiras com sintomas de murcha bacteriana na região amazônica. Os isolados foram identificados quanto à biovar e separados em graus de virulência em plantas de tomate, pimentão e chicória da Amazônia (*Eryngium foetidum*). Dos 70 isolados, 53 pertenciam à biovar 1, quatro à biovar N2 e 13 à biovar 3, confirmando a predominância da biovar 1 em tomateiro no Estado do Amazonas. O agrupamento dos isolados mostrou três classes distintas de virulência em tomate, sendo 44,3% dos isolados altamente virulentos, 37,1% medianamente virulentos e 18,6% fracamente virulentos. O agrupamento em pimentão classificou 20% de isolados como altamente virulentos, 27,1% como medianamente virulentos e 52,9% como fracamente virulentos. Quando inoculados em chicória da Amazônia, somente o isolado de chicória provocou murcha nesta hospedeira, sugerindo uma especificidade pouco comum para *R. solanacearum*. Na caracterização molecular, 46 isolados de tomateiro e 18 de outras 10 hospedeiras, coletados em áreas de terra-firme e de várzea, foram comparados por BOX-PCR. Os perfis genômicos revelaram alto grau de polimorfismo entre os isolados, divididos em cinco grupos, sem correlação entre hospedeira de origem, biovar, ecossistema ou local de coleta. O isolado de chicória da Amazônia foi o mais divergente, com apenas 6,4% de similaridade em relação aos demais. Os isolados de tomateiro estavam representados em três grupos. Os quatro isolados de tomateiro da biovar N2 formaram um agrupamento distinto dos isolados das demais biovars presentes na Amazônia.

Palavras-chave adicionais: murcha bacteriana, *Lycopersicon esculentum*, seqüências repetitivas, rep-PCR.

ABSTRACT

Pathogenic and molecular diversity of *Ralstonia solanacearum* isolates from the Brazilian Amazon

The diversity among 70 isolates of *Ralstonia solanacearum* collected from tomato and other hosts in the Brazilian Amazon was evaluated. Firstly, the isolates were identified at the biovar level and their virulence assessed by inoculating seedlings of tomato, sweet pepper and Amazon chicory (*Eryngium foetidum*). Fifty-three isolates were identified as biovar 1, four as biovar N2 and 13 as biovar 3, therefore confirming the prevalence of biovar 1 associated with tomato in the North Region of Brazil. Cluster analysis of the isolates allowed their separation into different virulence classes. On tomato, 44.3% of them were highly virulent, 37.1% were moderately virulent and 18.6% were weakly virulent. On peppers, 20% of the isolates were highly virulent, 27.1% moderately virulent and 52.9% were weakly virulent. When inoculated on Amazon chicory, only the chicory isolate caused wilt, thus revealing an uncommon specificity for *R. solanacearum*. Forty-six isolates from tomato and 18 from ten other hosts, collected in flooded and non-flooded areas, were then compared by BOX-PCR. Genomic fingerprints were highly polymorphic. Five groups were identified, without any clear-cut correlations among them with host of origin, biovar, ecosystem or geographic origin. The isolate obtained from *Eryngium foetidum* was the most divergent, with only 6.4% similarity to the other isolates. The tomato isolates were separated into three groups. All four biovar N2 isolates were grouped together and separated from the isolates representing the other biovars present in the Amazon region.

Additional keywords: bacterial wilt, *Lycopersicon esculentum*, repetitive DNA, rep-PCR.

INTRODUÇÃO

Ralstonia solanacearum (Smith, 1896) Yabuuchi *et al.* 1995 é o agente causador da murcha bacteriana em mais de 50 espécies botânicas (Hayward, 1994). Está distribuída

principalmente em regiões de clima tropical e subtropical, onde prevalecem condições de alta umidade e elevadas temperaturas (Hayward, 1991). Suas complexidades genotípica e fenotípica, e ampla distribuição no mundo levantaram questionamentos em relação à sua evolução em diferentes áreas geográficas, inclusive na Amazônia brasileira (Buddenhagen, 1985). Relatos indicam que é parte da flora microbiana nativa em muitas partes do mundo e a ocorrência de epidemias é consequência da introdução

Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor. Universidade de Brasília. Brasília DF. 2004.

de diversas espécies de plantas em áreas virgens (Kelman, 1953), como demonstrado também no Brasil pelo relato do “campo-biô” em batata (Lopes & Reifschneider, 1983; Lopes, 2005).

Devido à grande variabilidade de *R. solanacearum* em relação à gama de hospedeiras, distribuição geográfica, virulência, transmissibilidade por insetos, propriedades fisiológicas e adaptação a diferentes temperaturas, sistemas de classificação - mais ou menos complexos - aos níveis específico e sub-específico foram propostos (Elphinstone, 2005; Fegan & Prior, 2005). Entretanto, os sistemas de raças (Buddenhagen *et al.*, 1962) e biovars (Hayward, 1964) ainda são amplamente utilizados pela comunidade científica pela sua simplicidade e praticidade (Fegan & Prior, 2005). No Brasil, levantamentos conduzidos nas diversas regiões geográficas indicaram a existência da biovar 1 em todas as regiões, da biovar 2, predominantemente em climas amenos (Sul, Sudeste, Centro-Oeste), e da biovar 3 no Norte e Nordeste (Reifschneider & Takatsu, 1985). Em batata, as biovars 1 e 2 estão amplamente distribuídas no país, em parte devido à eficiente transmissão da doença em batata-semente (Lopes, 2005).

No Estado do Amazonas, onde se encontram dois ecossistemas bem definidos, o de várzea e o de terra-firme, a doença constitui um fator limitante para o cultivo de solanáceas, especialmente o tomateiro, que é cultivado em ambos os ecossistemas (Noda *et al.*, 1986; Coelho Neto *et al.*, 2003a, 2003b).

Em programas de melhoramento visando resistência à murcha bacteriana, é necessário considerar a variabilidade e a distribuição dos isolados na região de cultivo (Elphinstone, 1992). Embora se saiba que a biovar 1 é predominante na Região Norte, a biovar 3 também é encontrada atacando o tomateiro, mesmo sendo principalmente associada às culturas do pimentão e das pimentas (Coelho Netto *et al.*, 2003b).

Vários métodos baseados na análise genômica têm sido empregados para avaliação da diversidade genética em *R. solanacearum*, entre os quais destacam-se: RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA); análise do DNA ribossomal e do gene *hrp*; RC-PFGE (rare-cutting restriction endonucleases Pulsed-field gel electrophoresis); AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) e rep-PCR (repetitive-PCR) (Smith *et al.*, 1995; Jaunet & Wang, 1999; Poussier *et al.*, 1999; Martins, 2000; Yu *et al.*, 2003; Horita & Tsuchiya, 2001; Horita *et al.*, 2005). Recentemente, Fegan & Prior (2005) propuseram um novo sistema de filotipagem para caracterizar *R. solanacearum* em nível subespecífico, mas que ainda aguarda aceitação por parte da comunidade científica.

O conhecimento da variabilidade genética de *R. solanacearum* é fundamental na orientação de estratégias de controle e obtenção de cultivares resistentes à murcha bacteriana. Lopes *et al.* (1994), por exemplo, relataram que a murcha bacteriana do tomateiro é mais facilmente controlada por meio da resistência genética nos locais em que a biovar 3 do patógeno for prevalente. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo principal avaliar a diversidade patogênica e

molecular de isolados de *R. solanacearum* obtidos de tomateiro e de outras hospedeiras não solanáceas como a chicória, nos ecossistemas de terra-firme e de várzea da Região Amazônica.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção dos isolados

Os isolamentos obtidos de tomateiro foram realizados no Laboratório de Fitopatologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), em Manaus-AM, a partir de plantas de tomate e de outras hospedeiras com sintomas de murcha. Os isolados foram coletados em diferentes localidades no Amazonas, Pará e Acre, entre dezembro de 1997 e dezembro de 2000 tanto em várzea como em terra-firme. Outros isolados foram obtidos da coleção da Embrapa-Hortaliças, em Brasília DF, totalizando 70 isolados (Tabela 1). Utilizou-se, para fins de isolamento, o meio de cultura de Kelman (1953) e as culturas puras obtidas foram preservadas em água estéril, mantidas em temperatura ambiente. Com a finalidade de eliminar diferenças de virulência causada pelo aparecimento de mutantes espontâneos durante tempos diferentes de armazenamento das culturas, procedeu-se a inoculação de todos os isolados em tomateiro cv. IPA-5 (suscetível). As plântulas com dois pares de folhas (35 dias após a semeadura), produzidas em bandejas de isopor contendo substrato esterilizado, foram transferidas para vasos de ½ L contendo solo esterilizado e, cinco dias após, inoculadas por meio de ferimentos com alfinete entomológico nº 3, trespassando-se uma gota de inóculo, contendo cerca de 10⁸ ufc/mL, colocada na axila da folha. As plantas foram mantidas em casa de vegetação (20-40°C) com aquecimento noturno. Foi feito o reisolamento a partir de plantas sintomáticas e as novas culturas foram utilizadas nos testes posteriores, mantendo-se o número original da coleção.

Identificação dos isolados de *Ralstonia solanacearum* quanto à biovar

Os isolados foram submetidos aos testes bioquímicos para identificação da biovar, conforme recomendado por Hayward (1964). Isolados representativos de cada biovar pertencentes à coleção de culturas da Embrapa Hortaliças foram usados como testemunhas.

Testes de virulência em tomate, pimentão e chicória

Setenta isolados foram inoculados em plantas de tomate ‘Santa Clara’, produzidas em bandeja em casa de vegetação, 21 dias após a semeadura. A inoculação foi realizada pela imersão das raízes em suspensão bacteriana (aproximadamente 10⁸ ufc/mL). Em seguida, as plantas foram transferidas para vasos de ½ L contendo solo esterilizado, com posterior adição de 5 mL/planta da mesma suspensão bacteriana. O teste foi realizado com três repetições, sendo cada repetição constituída por três vasos e cada vaso com duas plantas. As avaliações foram feitas quatro, oito e 12 dias após a inoculação, com a média das leituras, utilizando-se escala de notas modificada de Winstead & Kelman (1952). As avaliações foram realizadas usando o Índice de

TABELA 1 - Designação, origem, características bioquímicas e moleculares dos isolados de *Ralstonia solanacearum* obtidos de tomateiro e outras hospedeiras na região amazônica brasileira

Número ¹	Isolado ²	Hospedeira	Ecossistema	Biovar	Grupo BOX ⁵	Local de coleta
01	98	Tomate	T ³	1	E	Estação INPA -AM Km 14
02	96	Tomate	T	1	D	Estação INPA -AM Km 14
03	60	Tomate	T	1	E	Itacoatiara-AM
04	66	Tomate	T	1	D	Ariáú INPA -AM
05	36	Tomate	T	1	E	Humaitá-AM
06	32	Tomate	T	1	E	Boca do Acre-AM
07	50	Tomate	T	1	nd ⁶	Caruarí-AM
08	49	Tomate	T	1	E	Manicoré-AM
09	65	Tomate	V ⁴	1	E	Ariáú INPA -AM
10	69	Tomate	V	1	E	Ariáú INPA -AM
11	77	Tomate	V	1	E	Ariáú INPA -AM
12	23	Tomate	V	1	E	Irاندuba-AM
13	70	Tomate	V	1	E	Ariáú INPA -AM
14	22	Tomate	V	1	C	Irاندuba-AM
15	21	Tomate	V	1	E	Irاندuba-AM
16	20	Tomate	V	1	E	Irاندuba-AM
17	40	Tomate	T	1	C	Humaitá-AM
18	38	Tomate	T	1	C	Humaitá-AM
19	47	Tomate	T	1	C	Manicoré-AM
20	33	Tomate	T	1	C	Boca do Acre-AM
21	95	Tomate	T	1	C	Estação INPA -AM Km 14
22	92	Tomate	T	1	E	Estação INPA -AM Km 14
23	26	Tomate	T	1	C	Autazes-AM
24	25	Tomate	T	1	C	Autazes-AM
25	03	Tomate	T	1	C	B. Constant-AM
26	88	Tomate	T	1	E	Estação INPA -AM Km 14
27	48	Tomate	T	1	D	Manicoré -AM
28	11	Tomate	T	1	D	Coari-AM
29	86	Tomate	T	1	C	Estação INPA -AM Km 14
30	72	Tomate	V	3	E	Ariáú INPA -AM
31	74	Tomate	V	3	E	Ariáú INPA -AM
32	24	Tomate	V	1	C	Irاندuba-AM
33	90	Tomate	T	3	D	Estação INPA -AM Km 14
34	82	Tomate	T	1	nd	Estação INPA -AM Km14
35	81	Tomate	T	3	D	Estação INPA -AM Km 14
36	01	Tomate	T	3	D	B. Constant-AM
37	04	Tomate	T	3	D	B. Constant-AM
38	12	Tomate	T	3	D	Coari-AM
39	94	Tomate	T	3	D	Estação INPA -AM Km 14
40	80	Tomate	T	3	D	Estação INPA -AM Km 14
41	28	Tomate	T	N2	B	Tarumã-AM
42	44	Tomate	T	N2	B	Manicoré-AM
43	45	Tomate	T	N2	B	Manicoré-AM
44	27	Tomate	T	N2	B	Tarumã-AM
45	18	Tomate	T	1	D	Tefé-AM
46	146	Pimenta longa	T	1	nd	Belém-PA
47	85	Tomate	T	1	D	Estação INPA -AM Km14
48	15	Pimenta de cheiro	T	3	D	Coari-AM
49	07	Pimentão	T	3	D	B. Constant-AM
50	13	<i>Melanthera discoidea</i>	T	1	C	Coari-AM
51	41	<i>Melanthera discoidea</i>	T	1	C	Humaitá-AM
52	58	Jiló	T	1	D	São G. da Cachoeira-AM
53	55	Pepino	T	1	D	São G. da Cachoeira-AM
54	56	Pepino	T	1	D	São G. da Cachoeira-AM
55	51	Berinjela	T	1	E	Parintins-AM
56	54	Berinjela	T	1	E	São G. da Cachoeira-AM
57	180	Maracujá	T	1	E	Belém -PA
58	181	Maracujá	T	1	E	Belém -PA
59	193	Pimenta longa	T	1	D	Acre
60	194	Pimenta longa	T	1	D	Acre
61	147	Pimenta longa	T	1	D	Belém-PA
62	177	Pimenta longa	T	1	E	Belém-PA
63	189	Chicória-da-Amazônia	T	1	A	Belém-PA
64	35	Tomate	T	1	D	Humaitá-AM
65	71	Tomate	V	3	D	Ariáú INPA -AM
66	188	Carirú	T	1	D	Belém-PA
67	192	Pimenta longa	T	1	D	Acre
68	64	Pimentão	V	1	nd	Ariáú- INPA -AM
69	05	Tomate	T	3	nd	B. Constant-AM
70	46	Tomate	T	1	nd	Manicoré-AM

¹Numeração dos isolados no dendrograma (Fig. 3) e no gel (Fig. 4)²Identificação dos isolados na Coleção de Culturas da Embrapa Hortaliças e nas Figuras 1 e 2.³Terra-Firme⁴Várzea⁵Grupos definidos pela análise de BOX-PCR conforme dendrograma da Fig.3.⁶não determinado

Murcha Bacteriana I.M.B. = $\{\sum (C \times P)\} / N$ onde: C = nota atribuída a cada classe de sintoma; P = número de plântulas em cada classe de sintomas e N = número total de plântulas inoculadas. A comparação dos IMB dos isolados foi feita pela análise de agrupamento dos valores das notas pelo método “average” (distância euclidiana) (The SAS System for Windows V8 1999-2000). Seguindo a mesma metodologia de inoculação e avaliação, os 70 isolados foram inoculados em plantas de pimentão e chicória. Em pimentão, realizou-se a inoculação em plantas da cv. Cascadura Ikeda, com 30 dias e as avaliações foram feitas seis, oito e 12 dias após a inoculação. Plântulas de chicória (*Eryngium foetidum*), hortaliça não convencional hospedeira de *R. solanacearum* no Estado do Pará (Lopes *et al.*, 2002), foram inoculadas da mesma maneira, 40 dias após a semeadura com a finalidade de avaliar seu comportamento quando desafiadas com isolados obtidos de tomateiros.

Caracterização molecular

Do total de isolados de *R. solanacearum* coletados (Tabela 1), 64 isolados, sendo 46 de tomate, e 18 de outras 10 espécies hospedeiras, dos ecossistemas de terra-firme (52 isolados) e de várzea (12 isolados), foram selecionados e comparados quanto aos perfis genômicos através de rep-PCR (repetitive-PCR).

Extração do DNA: Cada um dos isolados foi cultivado por 24 h em 4 mL de meio líquido YPS (Rhodes, 1959); em seguida, 10 µL foram transferidos para 2 mL do mesmo meio e mantidos em agitador orbital a temperatura ambiente, por mais 24 h. O processo de extração foi iniciado com 1,5 mL da cultura em tubos Eppendorf, de acordo com Martins (2000). Células bacterianas foram coletadas por centrifugação de 1,5 mL de meio YPS, a 6.000 x g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” foi congelado a -20°C por 1 h e, em seguida, descongelado a temperatura ambiente. Lavou-se o “pellet” com 100 µL de acetona (a -20°C), incubando por 10 min no gelo. Descartou-se a acetona e ressuspendeu-se o “pellet” em 500 µL de TE (10 mM de Tris, 1 mM de EDTA) e, em seguida, adicionou-se 50 µL de EDTA a 500 mM, 50 µL de SDS a 14% e 10 µL de proteinase K a 0,1%. Incubou-se por 1 h a 55°C e, logo após, adicionou-se igual volume de acetato de amônio (7,5 M) para precipitar o DNA, que foi coletado por centrifugação a 11.000 x g por 20 min. Lavou-se então o “pellet” com 500 µL de etanol 70% e centrifugou-se novamente por 5 min. Secou-se a vácuo e finalmente ressuspendeu-se o DNA em 50 µL de água milli-Q estéril. O DNA genômico obtido de cada isolado foi quantificado e armazenado a -20°C.

rep-PCR: Ensaios de rep-PCR foram conduzidos com os iniciadores (“primers”) correspondentes às três sequências repetitivas REP, ERIC e BOX (Louws *et al.*, 1994). PCR foi conduzida de acordo com as condições descritas por Martins (2000), com algumas alterações descritas a seguir. Para cada um dos três conjuntos de

“primers”, o volume final da reação (12 µL) foi constituído de tampão 1X [50 mM KCl, 20 mM Tris-HCL (pH 8,4)], 1,5 mM de MgCl₂, 50 pmol de cada “primer”, 0,2 mM de cada dNTP, 1,25 U de *Taq* polimerase e 20-40 ng de DNA por reação. A amplificação foi realizada em termociclador (GeneAmp-PCR System 9700) utilizando, para ERIC-PCR, o seguinte programa: 95°C por 7 minutos; 35 ciclos de 94°C/ 1 min, anelamento a 52°C /1 min, extensão a 65°C/ 8 min e uma etapa final de extensão a 65°C /15 min. Para REP e BOX-PCR, o mesmo programa foi empregado, exceto quanto às temperaturas de anelamento que foram 44 e 43°C, respectivamente. O volume total da reação foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Após a corrida das amostras em tampão TBE (Tris-Borato EDTA) 1 X por 3 h a 90 V, o gel foi corado com brometo de etídio (5,0 x 10⁷ g/mL). Os fragmentos amplificados foram visualizados em luz ultravioleta e fotodocumentados (Eagle Eye™ II – Stratagene).

Análise dos Dados: As análises dos perfis de amplificação foram realizadas visualmente e transformadas em dados binários, de acordo com a presença (1) ou ausência (0) de bandas. Os dados gerados foram analisados com o programa MVSP 3.1 (Multi-Variate Statistical Package, Version 3.11h/1985-2000, Kovach Computing Services). Os relacionamentos genéticos entre os isolados foram determinados pelo coeficiente de similaridade de Jaccard e a análise de agrupamento foi realizada de acordo com o método UPGMA (“Unweighted pair-group method using arithmetic averages”) (Sneath & Sokal, 1973).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Identificação dos isolados em biovars

De 70 isolados estudados, 53 foram identificados como biovar 1, quatro como biovar N2 (variante da biovar 2, também conhecido como 2T) e 13 como biovar 3 (Tabela 1). Os quatro isolados identificados como pertencentes à biovar N2 (Gillings & Fahy, 1993) foram obtidos de tomateiro. Esta biovar também foi isolada de tomateiro por Coelho Netto *et al.* (2004) na Região Norte; neste estudo, comprovou-se que esta variante tropical, que apresenta características bem diferentes da biovar 2A (raça 3), não está muito disseminada no Estado do Amazonas.

A prevalência da biovar 1 em tomateiro no Estado do Amazonas está de acordo com os resultados encontrados por Coelho Netto *et al.* (2003b), que analisaram 267 isolados da Região Norte. Em terra-firme, 80,4% dos isolados pertenciam à biovar 1, enquanto que em várzea, os isolados da biovar 1 representaram 37,4% e 87,8% nos ensaios de 1998 e de 2000, respectivamente.

Virulência em tomateiro

As plântulas de tomate mostraram sintomas de murcha a partir de três dias após a inoculação, com grande variação na virulência entre os isolados, representada no

teste de agrupamento que proporcionou a formação de três classes (Figura 1), sendo elas: classe I- com isolados altamente virulentos (44,3%), a classe II- com isolados

medianamente virulentos (37,1%) e classe III- com isolados fracamente virulentos (18,6%). Essa variabilidade foi também observada por Martins *et al.* (1988), que estudaram a

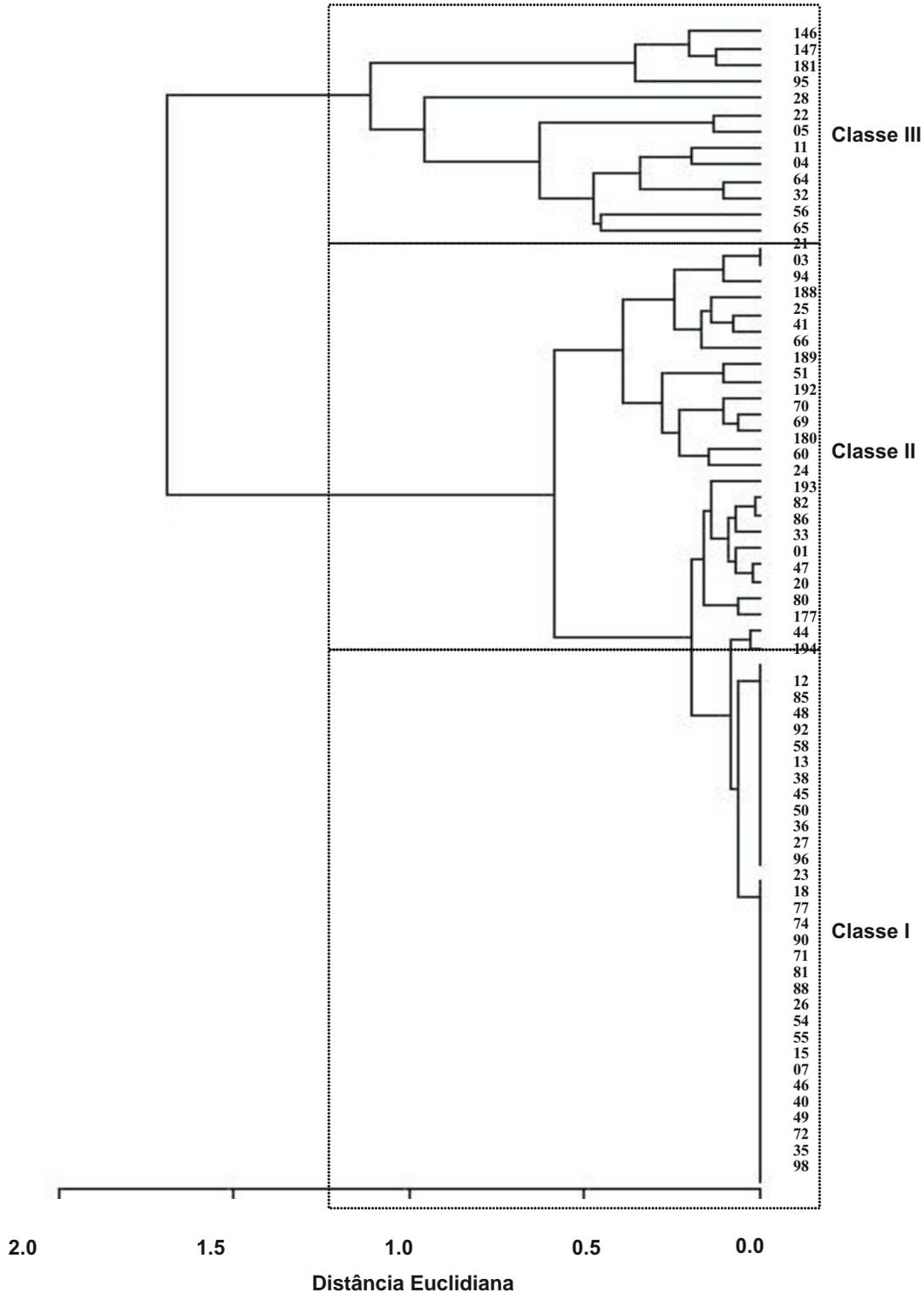


FIG. 1 - Dendrograma obtido a partir da análise de agrupamento dos isolados de *Ralstonia solanacearum* quanto à virulência em plantas de tomate. Classe I= isolados altamente virulentos, Classe II= isolados medianamente virulentos e Classe III= isolados fracamente virulentos. Numeração dos isolados conforme designação na Coleção de Culturas da Embrapa Hortaliças.

virulência de isolados das biovars 1 e 3 de *R. solanacearum* ao tomateiro, e parece ser constante em testes relacionados com este patógeno, independente da hospedeira.

Maior frequência de isolados da biovar 1 no grupo mais virulento justifica a observação de Lopes *et al.* (1994), que detectaram virulência diferenciada entre isolados das biovars 1 e 3 obtidos de tomateiros em diferentes localidades no Brasil. Esta relação biovar-específica também foi inferida por Coelho Netto *et al.* (2003a) ao encontrarem maior incidência de murcha bacteriana associada à biovar 1 em tomate e à biovar 3 em pimentas do gênero *Capsicum*. Assim, programas de melhoramento visando resistência à murcha bacteriana nas áreas amostradas é tarefa bastante complicada, devido à baixa eficácia da resistência na presença de isolados da biovar 1 (Lopes *et al.*, 1994).

Os quatro isolados da biovar N2 mostraram-se separados nas três classes de virulência em tomateiro (Tabela 1, Fig.1). Embora pouca informação exista sobre esta variante, segundo Elphinstone (1992), um isolado da biovar N2 foi mais agressivo a uma cultivar de tomateiro resistente às biovars 1 e 3. Assim, é necessário um maior entendimento sobre a virulência e a agressividade da biovar N2 e a disponibilidade de fontes de resistência a ela, embora aparentemente não represente uma ameaça para o cultivo de tomate na região por não ser muito frequente e porque apresenta menor sobrevivência no solo que as biovars 1 e 3 (Pereira *et al.*, 2001).

Virulência em pimentão e chicória

O agrupamento do grau de virulência em pimentão mostrou que 20% dos isolados foram altamente virulentos (classe III), 27,1% medianamente virulentos (classe II) e 52,9% foram fracamente virulentos (classe I) (Figura 2). Assim, a maioria dos isolados, quando inoculados em plantas de pimentão, mostrou-se fracamente virulenta, diferentemente do que aconteceu quando inoculados em plantas de tomate. Este resultado está em concordância com Coelho Netto *et al.* (2003a) e com Lopes *et al.* (1994), que observaram que isolados da biovar 3 eram mais virulentos a pimentão e os isolados da biovar 1 mais virulentos a tomate. No presente estudo, o número de isolados obtidos de pimentão não permitiu uma análise mais completa de inoculação cruzada com as duas hospedeiras.

Um resultado interessante e inesperado indicou que as plantas de chicória foram infectadas somente pelo isolado obtido desta hospedeira (isolado CNPH 189), sugerindo uma especificidade que deve ser mais estudada por ser rara quando se trata de *R. solanacearum*. Por outro lado, este mesmo isolado causou murcha tanto em pimentão quanto em tomate.

rep-PCR

A amplificação por PCR do DNA de todos os 64 isolados de *R. solanacearum* foi possível somente com o “primer” BOX, gerando 28 amplicons, variando de 360 a 2072 pb, com perfis reproduzíveis e de boa resolução, a uma

temperatura de anelamento de 43 °C (Figura 4). Embora tenham sido testadas diferentes temperaturas de anelamento para aperfeiçoar as condições de amplificação (47, 50, 51, 52 e 53°C), para cerca de 50% dos isolados nenhuma banda foi observada com os “primers” REP e ERIC ou, quando houve amplificação, as bandas foram de baixa intensidade. Para *R. solanacearum*, o sucesso e utilidade dos “primers” REP, ERIC e BOX para revelar variabilidade intraespecífica ou caracterizar isolados tem sido variável. Segundo Jaunet & Wang (1999), foi possível avaliar a variação genotípica entre isolados de tomate de Taiwan com os três “primers”. No trabalho de Martins (2000) foi observada amplificação reproduzível somente com o “primer” REP, tendo sido também testadas diferentes temperaturas de anelamento. Já Cruz *et al.* (2002) usaram somente o “primer” BOX para estudar a diversidade genética de isolados portugueses de *R. solanacearum* e observaram a alta capacidade discriminatória desse “primer”, revelando uma grande quantidade de bandas polimórficas entre os isolados. Este resultado concorda com Silveira *et al.* (2005), que caracterizaram isolados de *R. solanacearum* das biovars 1 e 2 provenientes de quatro regiões produtoras de batata no Rio Grande do Sul utilizando marcadores ERIC e BOX, e demonstraram ter o primer BOX maior capacidade em revelar polimorfismo entre isolados da biovar 1 que o “primer” ERIC. A análise visual dos perfis eletroforéticos gerados por BOX-PCR dos isolados aqui estudados revelou um alto grau de polimorfismo, observado principalmente na região entre 600 a 1500 pb. Contudo, não foi observado padrão de amplificação específico para os isolados pertencentes aos dois ecossistemas utilizados no trabalho (várzea e terra-firme) ou às diferentes biovars (1, 3 e N2).

A caracterização molecular dos isolados com o iniciador BOX permitiu a construção de um dendrograma baseado no coeficiente de similaridade de Jaccard (Figura 3). Ao nível de 23% de similaridade, cinco grupos foram identificados: o grupo A compreendendo o isolado nº 63 (CNPH 189, chicória, biovar 1) obtido de terra-firme no Pará; o grupo B, compreendendo quatro isolados pertencentes a uma mesma hospedeira (tomate, biovar N2) todos coletados em terra-firme no Amazonas; o grupo C, compreendendo 13 isolados (tomate e *Melanthera discoidea*, biovar 1, terra-firme e várzea) de localidades no Amazonas, sendo que aproximadamente 85% dos isolados deste grupo pertencem ao ecossistema de terra-firme; o grupo D, compreendendo 25 isolados de diversas hospedeiras (tomate, pimenta-longa, pepino, maracujá, berinjela e jiló), pertencentes às biovars 1 e 3, de ecossistemas de terra-firme e de várzea e de localidades no Amazonas, Pará e Acre; e o grupo E, formado pelos 21 isolados restantes de tomate, berinjela, pimenta longa e maracujá, pertencentes às biovars 1 e 3, originados tanto de terra-firme quanto de várzea, e obtidos de diferentes localidades no Amazonas e Pará. Isolados da biovar N2 foram observados somente no grupo B, indicando maior homogeneidade genética nessa biovar que nas biovars 1 e 3, apesar do número pequeno de isolados analisados. Esta

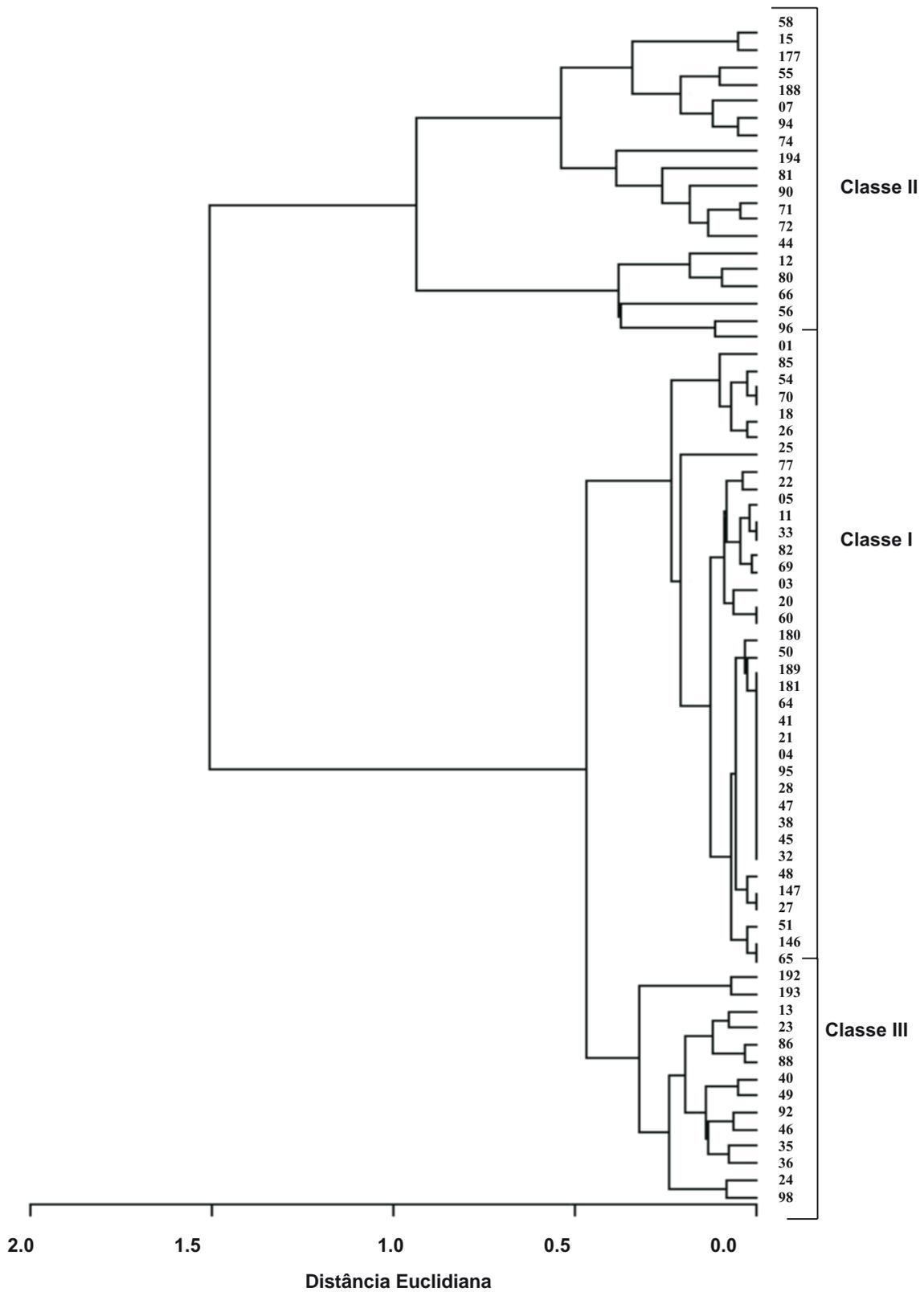


FIG. 2 - Dendrograma obtido a partir da análise de agrupamento dos isolados de *Ralstonia solanacearum* quanto à virulência em plantas de pimentão. Classe I= isolados fracamente virulentos, Classe II= isolados medianamente virulentos e Classe III= isolados altamente virulentos. Numeração dos isolados conforme designação na Coleção de Culturas da Embrapa Hortaliças.

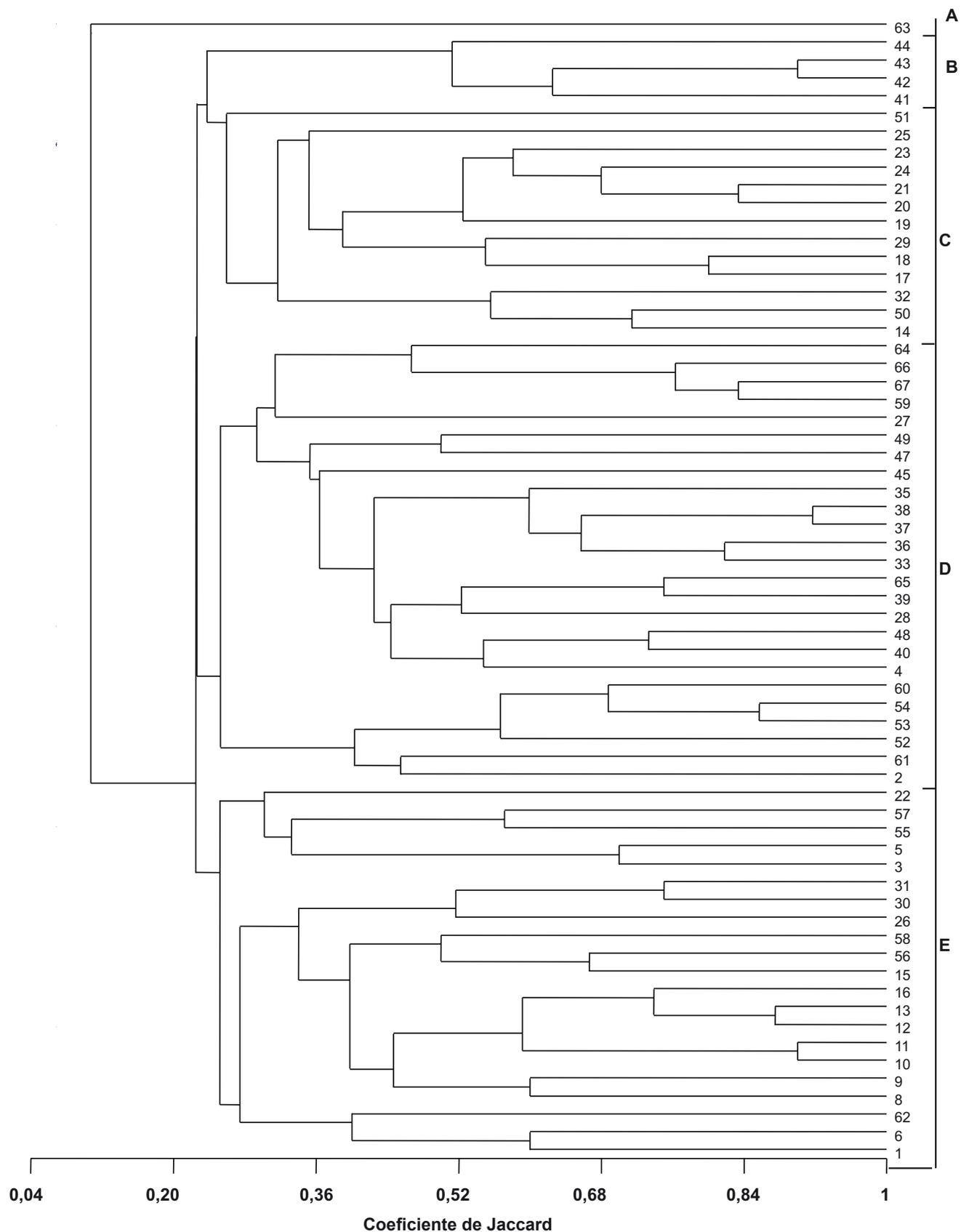


FIG. 3 - Dendrograma obtido a partir da análise de agrupamento dos isolados de *Ralstonia solanacearum* quanto aos perfis genômicos obtidos por BOX-PCR. Numeração dos isolados conforme designação na coluna 1 da Tabela 1.

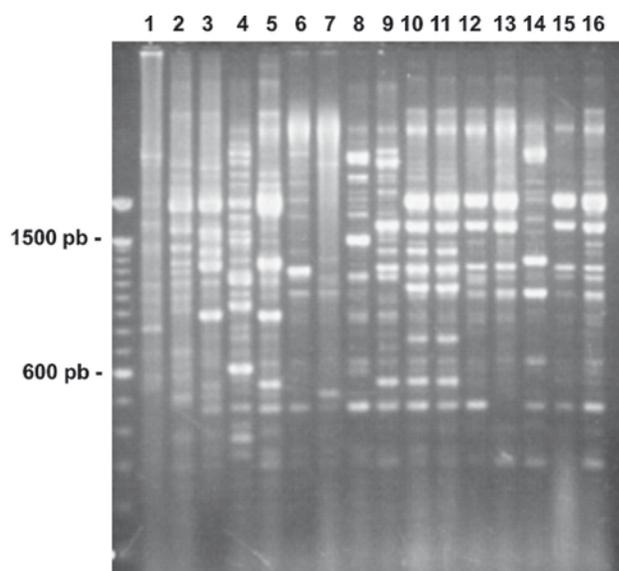


FIG. 4- Produtos da amplificação gerados por BOX-PCR a partir do DNA genômico de diferentes isolados de *Ralstonia solanacearum*. Gel de agarose a 1,5%. Numeração dos isolados conforme designação na coluna 1 da Tabela 1. Marcador de peso molecular: 100 bp-ladder (GIBCO-BRL).

observação concorda com os resultados de Horita & Tsuchiya (2001), que agruparam todos os isolados da biovar N2 em dois grandes grupos, com formação de subgrupos distintos entre isolados do Brasil e Japão. Segundo os mesmos autores, a biovar N2, com provável origem na Amazônia, é encontrada em regiões de clima tropical e baixa altitude, possui um grande número de hospedeiras, e não é equivalente à biovar 2A (raça 3), encontrada principalmente nas regiões mais frias do país, quase sempre associada à cultura da batata.

Os isolados de tomate foram separados em quatro grupos (B-E), sendo que a maioria dos isolados de várzea (75%) concentraram-se num único grupo (E), enquanto que 70% dos isolados de terra-firme foram reunidos nos grupos D e E. Observou-se que isolados pertencentes à biovar 1 foram identificados em todos os grupos genômicos identificados, exceto no grupo B, concordando com dados obtidos sobre maior heterogeneidade fenotípica da biovar 1 em relação às biovars N2 e 3. Uma maior versatilidade tem sido atribuída à biovar 1, por infectar ampla gama de hospedeiras e ser mais competitiva no solo do que a biovar 2, que é especializada em batata e limitada em outras hospedeiras (Hayward, 1994).

Observou-se uma clara diferença genotípica entre o isolado 63 (CNPH 189, biovar 1), obtido de planta de chicória e coletado no Pará, pois este mostrou somente 6,4% de similaridade em relação aos demais, utilizando-se BOX-PCR. Conforme indicado no teste de virulência, foi o único capaz de induzir sintomas de murcha em plantas de chicória. Sendo assim, é importante analisar outros isolados de chicória para confirmação de sua especialização por hospedeira e da baixa similaridade genética em relação aos outros isolados da Amazônia.

O sequenciamento de regiões do genoma, como o gene do rRNA de 16S, poderá ser mais informativo para caracterizar os isolados de chicória e para o correto estabelecimento de relações filogenéticas entre esses isolados e os demais. A possibilidade de tratar-se de outra espécie do gênero *Ralstonia* ou patovar da espécie *R. solanacearum* também deve ser alvo de investigação.

O alto nível de polimorfismo encontrado entre os 64 isolados da raça 1 da Região Amazônica, sendo a sua maioria de tomateiro, é similar a outros estudos realizados com raça 1, os quais têm mostrado alta variabilidade genética nas populações obtidas de diversas solanáceas (Jaunet & Wang, 1999; Frey *et al.*, 1996; Martins, 2000). Apesar de não ter sido observada correlação entre perfis genômicos, local de coleta e ecossistema de origem dos isolados estudados, pode-se verificar que foi possível separar os isolados da biovar N2 das biovars 1 e 3. O mesmo foi observado no trabalho realizado por Van der Wolf *et al.* (1998), onde também se observou a diferenciação de isolados de diferentes biovars.

Neste estudo, uma coleção de isolados de *R. solanacearum* da Amazônia foi caracterizada quanto a propriedades bioquímicas, virulência em três hospedeiras e padrões genômicos obtidos por BOX-PCR. Este é um primeiro e importante passo visando melhor conhecer a variabilidade do patógeno na região para desenvolvimento de estratégias eficientes de controle e obtenção de cultivares resistentes à murcha bacteriana, mais adaptadas à região amazônica.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos pesquisadores Milton Paz Lima, Leonardo S. Boiteux e Maria Esther N.F. Boiteux pela colaboração e à CAPES pela concessão de bolsa de estudo a S.B. Costa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BUDDENHAGEN, I. Bacterial wilt revisited. *In*: Persley, G.J. Bacterial Wilt Disease - in Asia and the South Pacific. Los Baños, ACIAR. Proceedings n°. 13. 1985. pp. 126-143.
- BUDDENHAGEN, I.W., SEQUEIRA, L. & KELMAN, A. Designation of races of *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 52:726. 1962.
- COELHO NETTO, R.A., NODA, H. & BOHER, B. Agressividade de isolados de *Ralstonia solanacearum* provenientes de solanáceas no Estado do Amazonas. *Summa Phytopathologica* 29:208-211. 2003a.
- COELHO NETTO, R.A., PEREIRA, B.G., NODA, H. & BOHER, B. Caracterização de isolados de *Ralstonia solanacearum* obtidos de tomateiros em várzea e em terra firme no Estado do Amazonas. *Fitopatologia Brasileira* 28:362-366. 2003b.
- COELHO NETTO, R.A., PEREIRA, B.G., NODA, H. & BOHER, B. Murcha bacteriana no Estado do Amazonas, Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 29:21-27. 2004.
- CRUZ, R., TENREIRO, R., COSTA, M., DIOGO, E., ELOY, M. & OLIVEIRA, H. Genetic diversity of portuguese isolates of *Ralstonia*

- solanacearum* by minisatellite primed PCR and BOX-PCR. 3rd International Bacterial Wilt Symposium. South Africa. p. 101. 2002.
- ELPHINSTONE, J.G. Virulence of isolates of *Pseudomonas solanacearum* from worldwide sources on resistant and susceptible tomato cultivars. In: Lemattre, M., Fregoun, S., Rudolph, K. & Swings, J.G. (Eds.) Plant Pathogenic Bacteria. Versailles. 1992. pp. 599-604.
- ELPHINSTONE, J.G. The current bacterial wilt situation: a global overview. In: Allen, C., Prior, P. & Hayward, A.C. (Eds.) Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. 2005. pp. 9-28.
- FEGAN, M. & PRIOR, P. How complex is the “*Ralstonia solanacearum* species complex”? In: Allen, C., Prior, P. & Hayward, A.C. (Eds.) Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. 2005. pp. 449-461.
- FREY, P., SMITH, J.J., ALBAR, L., PRIOR, P., SADDLER, G.S., TRIGALET-DEMERY, D. & TRIGALET, A. Bacteriocin typing of *Burkholderia (Pseudomonas) solanacearum* race 1 of the French West Indies and correlation with genomic variation of the pathogen. Applied and Environmental Microbiology 62:473-479. 1996.
- GILLINGS, M. & FAHY, P. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum* biovars 2 and N2 assessed using restriction endonuclease analysis of total genomic DNA. Plant Pathology 42:744-753. 1993.
- HAYWARD, A.C. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. Journal of Applied Bacteriology 27: 265-277. 1964.
- HAYWARD, A.C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annual Review of Phytopathology 29:65-87. 1991.
- HAYWARD, A.C. The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. In: Hayward, A.C. & Hartman, G.L. (Eds.) Bacterial wilt – the disease and causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. Wallingford. CAB International. 1994. pp. 9-24.
- HORITA, M. & TSUCHIYA, K. Genetic diversity of Japanese strains of *Ralstonia solanacearum*. Phytopathology 91:399-407. 2001.
- HORITA, M., TSUCHIYA, K. & OOSHIRO, A. Characteristics of *Ralstonia solanacearum* biovar N2 strains in Asia. Journal of Phytopathology 253:209-213. 2005.
- JAUNET, T.X. & WANG, J.F. Variation in genotype and aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* race 1 isolated from tomato in Taiwan. Phytopathology 89:320-327. 1999.
- KELMAN, A. The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum* - A literature review and bibliography. Raleigh. North Carolina Agricultural Experiment Station Technical Bulletin n°99. 1953.
- LOPES, C.A. Murchadeira da batata. Publicação Técnica ABBA, Itapetininga, SP. 2005.
- LOPES, C.A. & REIFSCHNEIDER, F.J.B. Bacterial disease of potatoes in Brazil: present and future trends in research. In: Hooker, W.J. (Ed.) Research for the potato in the year 2000, Lima, 1983. pp.1 21-122.
- LOPES, C.A., POLTRONIERI, L.S. & POLTRONIERI, M.C. New hosts of *Ralstonia solanacearum* in the Brazilian Amazon. In: Prior, P. (Ed.) Bacterial Wilt Newsletter, Austrália. 2002. pp. 2-3.
- LOPES, C.A., QUEZADO-SOARES, A.M. & MELO, P.E. Differential resistance of tomato cultigens to biovars 1 and 3 of *Pseudomonas solanacearum*. Plant Disease 78:1091-1094. 1994.
- LOUWS, F.J., FULBRIGHT, D.W., STEPHENS, C.T. & DE BRUIJN, F.J. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* strains generated with repetitive sequences and PCR. Applied and Environmental Microbiology 60:2286-2295. 1994.
- MARTINS, O.M. Polymerase chain reaction in the diagnostic of bacterial wilt, caused by *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* PhD Thesis. Georg-August University Göttingen, Germany. 2000.
- MARTINS, O.M., TAKATSU, A. & REIFSCHNEIDER, F.J.B. Virulência de biovars 1 e 3 de *Pseudomonas solanacearum* ao tomateiro. Fitopatologia Brasileira 13:162-166. 1988.
- NODA, H., PALHEN, A. VON DER & SILVA-FILHO, D. F. Avaliação da resistência de progênies de tomate à murcha bacteriana em solo naturalmente infestado por *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Dows. Revista Brasileira de Genética 9:55-56. 1986.
- PEREIRA, B.G., COELHO NETTO, R. A. & BOHER, B. Avaliação de espécies na supressão de *Ralstonia solanacearum*. Fitopatologia Brasileira 26(Supl.):545. 2001. (Resumo)
- POUSSIER, S., VANDEWALLE, P. & LUISETTI, J. Genetic diversity of African and worldwide strains of *Ralstonia solanacearum* as determined by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hrp* gene region. Applied and Environmental Microbiology 65:2184-2194.1999.
- REIFSCHNEIDER, F.J.B. & TAKATSU, A. *Pseudomonas solanacearum* no Brasil - aspectos macroepidemiológicos. Fitopatologia Brasileira (Supl.)10:213. 1985. (Resumo)
- RHODES, M.E. The characterization of *Pseudomonas fluorescens*. Journal of Genetic Microbiology 21:221-263. 1959.
- SILVEIRA, J.R.P, DUARTE, V., MORAES, M.G., OLIVEIRA, A.M.R., BARNI, V. & MACIEL, J.L.N. Caracterização de estirpes de *Ralstonia solanacearum* isoladas de plantas de batata com murcha bacteriana por PCR-rep e RAPD. Fitopatologia Brasileira 30:615-622. 2005.
- SMITH, J.J., OFFORD, L.C., HOLDERNESS, M. & SADDLER, G.S. Genetic diversity of *Burkholderia solanacearum* (synonym *Pseudomonas solanacearum*) race 3 in Kenya. Applied and Environmental Microbiology 61:4263-4268. 1995.
- SNEATH, P.H.A. & SOKAL, R.R. Numerical Taxonomy: the principles and practice of numerical classification. San Francisco CA. W.H. Freeman. 1973.
- VAN DER WOLF, J.M., BONANTS, P.J.M., SMITH, J.J., HAGENAAR, M., NIJHUIS, E., VAN BECKHOVEN, J.R.C.M., SADDLER, G.S., TRIGALET, A. & FEULLADE, R. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* race 3 in Western Europe determined by AFLP, RC-PFGE and REP-PCR. In: Prior, P., Allen, C. & Elphinstone, J. (Eds.) Bacterial wilt disease – molecular and ecological aspects. Germany. INRA Editions. 1998. pp.44-49.
- WINSTEAD, N.N. & KELMAN, A. Inoculation techniques for evaluating resistance to *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathology 42:634-638. 1952.
- YU, Q., ALVAREZ, A.M., MOORE, P.H., ZEE, F., KIM, M.S., DE SILVA, A., HEPPELRY, P.R. & MING, R. Molecular diversity of *Ralstonia solanacearum* isolated from ginger in Hawaii. Phytopathology 93:1125-1130. 2003.