



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
FITOPATOLOGIA**

**ESPÉCIES DE *Ralstonia* NO BRASIL: CARACTERIZAÇÃO  
FENOTÍPICA, MOLECULAR, NOVAS FONTES DE  
RESISTÊNCIA EM TOMATEIRO E PATOGENICIDADE EM  
CAFEEIRO**

**MAURÍCIO ROSSATO**

**Brasília – DF**

**2016**

**MAURÍCIO ROSSATO**

**ESPÉCIES DE *Ralstonia* NO BRASIL: CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA,  
MOLECULAR, NOVAS FONTES DE RESISTÊNCIA EM TOMATEIRO E  
PATOGENICIDADE EM CAFEIEIRO**

Tese apresentada à Universidade de  
Brasília como requisito parcial para a  
obtenção do título de Doutor em  
Fitopatologia pelo Programa de Pós  
Graduação em Fitopatologia

**Orientador**

Leonardo Silva Boiteux, Ph.D.

**BRASÍLIA  
DISTRITO FEDERAL - BRASIL  
2016**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Rossato, Maurício.

Espécies de *Ralstonia* no Brasil: caracterização fenotípica, molecular, novas fontes de resistência em tomateiro e patogenicidade em cafeeiro. / Maurício Rossato.

Brasília, 2016.

Número de páginas 165 p.

Tese de doutorado. Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília.

1. murcha bacteriana, *Ralstonia pseudosolanacearum*, biovares, melhoramento.

I. Universidade de Brasília. PPG/FIT.

II. Espécies de *Ralstonia* no Brasil: caracterização fenotípica, molecular, novas fontes de resistência em tomateiro e patogenicidade em cafeeiro.

## DEDICATÓRIA

*Dedico aos meus pais, Nivaldo e Rosa, que sempre me  
estimularam pela busca do saber*

**“None of us is as smart as all of us”**

*Kenneth H. Blanchard*

## AGRADECIMENTOS

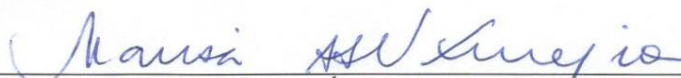
- Primeiramente agradeço a Deus.
- Agradeço à Capes e ao CNPq, pelo suporte financeiro durante o período do doutorado.
- Agradeço ao meu orientador, Dr. Leonardo e à Dra. Maria Esther de Noronha Fonseca que me receberam no laboratório de Melhoramento Genético da Embrapa Hortaliças e me orientaram.
- Agradeço ao Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília, pelos professores excelentes e dedicados.
- Agradeço à Embrapa Hortaliças, local que convivi por 8 anos excepcionais e onde aprendi o que me permite hoje chegar ao nível de doutor. Que me forneceu espaço para desenvolvimentos pesquisas desde a minha graduação até o doutorado.
- Agradeço ao Dr. Carlos Alberto Lopes que me orientou desde o começo da minha vida acadêmica sempre indicando a forma mais ética de fazer pesquisa.
- Agradeço a todos meus amigos e mentores da Embrapa Hortaliças que me acompanharam nesse aprendizado e me auxiliaram: Amanda, Cecília, Celma, Danielle, Edivânio, Elenice, Fabiana, Fred, Luana, Luiz, Michele, Niday, Rayane, Túlio, Dra. Alice Quezado, Dr. Ailton Reis, Dr. Jadir Pinheiro e outros tantos que por aí passaram.
- Agradeço aos meus familiares que me deram suporte.
- Agradeço ao Raphael que me ajudou a trilhar esse caminho tortuoso que é a pós-graduação.
- Agradeço à minha amiga Cléia que estuda comigo desde a graduação, e que me forneceu a oportunidade de entrar na Embrapa Hortaliças para meu primeiro estágio.
- Agradeço à minha amiga Thais que me ajudou com os conhecimentos em *Ralstonia* e sempre foi uma boa companhia.
- Agradeço aos demais amigos que fizeram parte da minha formação e por ventura se separaram pelos caminhos da vida.

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação do **Doutor Leonardo Silva Boiteux**, com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.

**Espécies de *Ralstonia* no Brasil: Caracterização Fenotípica, Molecular, Novas Fontes de Resistência em Tomateiro e Patogenicidade em Cafeeiro**

**Maurício Rossato**

TESE APROVADA em 05/10/2016 por:



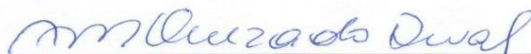
Professora, Doutora Marisa Álvares da Silva Velloso Ferreira (Universidade de Brasília)  
Examinadora



Doutora Thais Riberio Santiago (Embrapa Agroenergia)  
Examinadora



Doutora Sueli Corrêa Marques Mello (Embrapa Cenargen)  
Examinadora



Doutora Alice Maria Quezado Duval (Embrapa Hortaliças)  
Examinadora



Pesquisador, Ph.D. Leonardo Silva Boiteux  
Orientador (Presidente)

**BRASÍLIA – DISTRITO FEDERAL  
BRASIL  
2016**

## SUMARIO

LISTA DE TABELAS .....	VI
LISTA DE FIGURAS.....	VII
RESUMO GERAL .....	X
GENERAL ABSTRACT .....	XII

INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO DE LITERATURA.....	1
1. O PATÓGENO <i>Ralstonia solanacearum</i> .....	1
2. TAXONOMIA E HISTÓRICO.....	2
3. O GENOMA DO COMPLEXO DE ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Ralstonia</i> .....	5
3. A DOENÇA.....	7
4. CONTROLE E MELHORAMENTO GENÉTICO .....	8
5. PATOGÊNESE.....	9
6. MARCADORES MOLECULARES .....	10
6.1. RAPD .....	11
6.2. BULK SEGREGANT ANALYSIS (BSA) .....	11
6.3. SCAR.....	12
7. ANTIBIÓTICOS E MEIOS SEMI-SELETIVOS .....	12
8. OBJETIVOS .....	14
8.1. OBJETIVO GERAL.....	14
8.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	15
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	15

CARACTERIZAÇÃO DE UM ISOLADO DE <i>Ralstonia solanacearum</i> CAPAZ DE SUPERAR A RESISTÊNCIA DA LINHAGEM DE TOMATEIRO ( <i>Solanum lycopersicum</i> ) ‘HAWAII 7996’ .....	24
RESUMO .....	24
ABSTRACT .....	26
1. INTRODUÇÃO .....	28
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
2.1. Caracterização do isolado CNPH-RS 488.....	33
2.1.1. Identificação da biovar .....	33
2.1.2. Identificação de filotipo.....	34
2.2. Testes de patogenicidade .....	34
2.2.1. Teste de patogenicidade em tomateiro e batateira .....	34
2.3. Correlação UFC/mL e absorbância e titulação de infectividade .....	35
2.4. Quantificação de Exopolissacarídeo (EPS). .....	37
2.5. Produção de biofilme .....	39
2.6. Sensibilidade <i>in vitro</i> a antibióticos .....	40
2.7. Resposta de uma gama de plantas hospedeiras a inoculações com o isolado CNPH-RS 488 .....	40
3. RESULTADOS .....	41
3.1. Caracterização da biovar e filotipo do isolado CNPH RS-488.....	41
3.2. Teste de patogenicidade em tomateiro e batateira .....	42
3.3. Titulação de infectividade .....	43
3.4. Produção de EPS .....	46
3.5. Produção de biofilme.....	47
3.6. Sensibilidade <i>in vitro</i> a antibióticos .....	49
3.7. Perfil de virulência em uma gama de plantas hospedeiras .....	51
4. DISCUSSÃO .....	52
5. CONCLUSÕES.....	58



<b>6. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>59</b>
<b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>59</b>

<b>SISTEMA PARA IDENTIFICAÇÃO DE BIOVARES VIA PCR EMPREGANDO INICIADORES ESPECÍFICOS DERIVADOS DA ANÁLISE GENÔMICA COMPARATIVA DE ISOLADOS DO COMPLEXO DE ESPÉCIES DE <i>Ralstonia</i> .....</b>	
<b>RESUMO.....</b>	<b>69</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>71</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>72</b>
1.1. Objetivo Geral.....	77
1.2. Objetivos específicos .....	78
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>78</b>
2.1. Seleção dos isolados para estabelecimento de <i>bulks</i> contrastantes para as diferentes biovares .....	78
2.2. Uso do sistema de marcadores RAPD .....	81
2.3. Clonagem e Sequenciamento .....	82
2.4. Análise de sequências dos <i>amplicons</i> RAPD polimórficos e desenho de <i>primers</i> SCARs.....	83
2.5. Análise de sequência, identificação de regiões com identidade e localização física dos marcadores RAPD e SCAR polimórficos .....	83
2.6. Desenvolvimento de <i>primers</i> específicos para o gene codificador da sorbitol desidrogenase (um dos genes candidatos em associação com o perfil de biovares).....	85
2.7. Avaliação dos <i>primers</i> em gradientes de temperaturas de anelamento .....	85
<b>3. RESULTADOS .....</b>	<b>86</b>
3.1. Estabelecimento dos <i>Bulks</i> de isolados contrastantes para cada biovar .....	86
3.2. Uso do sistema de marcadores RAPD .....	86
3.3. Clonagem e sequenciamento .....	89
3.4. Desenho de <i>primers</i> .....	89
3.5. Análise das sequências dos <i>amplicons</i> polimórficos entre isolados contrastantes para as diferentes biovares .....	91
<b>4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>94</b>
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>99</b>
<b>6. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>99</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>100</b>

<b>BUSCA POR FONTES DE RESISTÊNCIA A ISOLADOS DE <i>Ralstonia solanacearum</i> DIVERGENTES EM RELAÇÃO À CAPACIDADE DE INFECTAR A LINHAGEM <i>Solanum lycopersicum</i> ‘HAWAII 7996’ .....</b>	
<b>RESUMO.....</b>	<b>107</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>108</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>109</b>
1.1. O complexo de espécies de <i>Ralstonia</i> , agente causal da murcha bacteriana do tomateiro. ....	109
1.2. O controle da murcha bacteriana via melhoramento genético .....	110
1.3. <i>Solanum peruvianum</i> e seu potencial como fonte de genes de resistência a doenças .....	111
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>113</b>
2.1. Seleção de isolados .....	113
2.2. Genótipos utilizados nas avaliações.....	114
2.3. Preparo do inóculo.....	114
2.4. Inoculação e avaliação .....	115
<b>3. RESULTADOS .....</b>	<b>116</b>
3.1. Avaliação de genótipos de tomateiro do banco de germoplasma da Embrapa Hortaliças.....	116
<b>4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>119</b>
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>122</b>
<b>6. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>122</b>

<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>123</b>
---	------------

<b>CARACTERIZAÇÃO DO CAFEEIRO (<i>Coffea arabica</i> – FAMÍLIA RUBIACEAE) COMO HOSPEDEIRO DE ISOLADOS DE <i>Ralstonia pseudosolanacearum</i> FILOTIPO</b>	
<b>I.....</b>	<b>130</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>130</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>131</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>132</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>134</b>
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>135</b>
<b>4. DISCUSSÃO.....</b>	<b>139</b>
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>142</b>
<b>6. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>142</b>
<b>7.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>143</b>
<b>CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>147</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Novas propostas de divisão do complexo de espécies do gênero <i>Ralstonia</i> elaboradas por dois grupos de pesquisa: Remenant <i>et al.</i> (2011) e Safni <i>et al.</i> (2014) a partir da divisão previamente proposta por Fegan & Prior (2005). .....	4
<b>Tabela 2.</b> Lista de isolados do complexo de espécies de <i>Ralstonia</i> com genoma sequenciado e suas respectivas características. ....	5
<b>Tabela 3.</b> Lista de meios de cultura semi-seletivos, ano de desenvolvimento, seus respectivos componentes e antibióticos empregados. ....	14
<b>Tabela 4.</b> Lista de isolados do complexo de espécies de <i>Ralstonia</i> usados nos experimentos com suas respectivas hospedeiras, local de coleta, data do isolamento, biovar e filotipo. Isolados com origem no Brasil foram identificados com o Estado/País de origem, isolados estrangeiros foram identificados com o país de origem. ....	36
<b>Tabela 5.</b> Percentagem de plantas apresentando sintomas de murcha em testes de patogenicidade conduzidos com quatro isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i> (raça 3/biovar 2). Plantas de duas linhagens de tomateiro, ‘L390’ (suscetível) e ‘Hawaii 7996’ (resistente) e da batateira suscetível ‘Monalisa’ foram inoculadas pelo método de penetração do caule. ....	43
<b>Tabela 6.</b> Resposta de sensibilidade <i>in vitro</i> de 48 isolados de quatro biovars (1, 2A, 2T e 3) do complexo de espécies de <i>Ralstonia</i> a 16 antibióticos e ao meio semi-seletivo SMART de (Kawanishi <i>et al.</i> , 2011). (+) = crescimento; (-) = inibição de crescimento. Os números na tabela representam o diâmetro do halo de inibição em centímetros. ....	49
<b>Tabela 7.</b> Lista dos isolados do complexo de espécies de <i>Ralstonia</i> com genomas completos disponíveis na base de dados do GenBank e EMBL que foram utilizados em análises via subtração <i>in silico</i> em busca de regiões exclusivas para as diferentes biovars. ....	84
<b>Tabela 8.</b> Lista das biovars e os respectivos <i>primers</i> RAPD com polimorfismos entre as biovars do complexo de espécies de <i>Ralstonia</i> . ....	86
<b>Tabela 9.</b> <i>Primers</i> RAPD utilizados por biovar estudada de isolados do complexo de espécies de <i>Ralstonia</i> com seus respectivos <i>amplicons</i> . ....	89
<b>Tabela 10.</b> Lista dos pares de <i>primers</i> desenhados e dos <i>amplicons</i> sequenciados para marcadores gerados para cada biovar do complexo de espécies de <i>Ralstonia</i> , com suas respectivas características como: genoma com maior identidade com o <i>amplicon</i> sequenciado via análise com BLAST, anotação da região homóloga ao <i>amplicon</i> , porcentagem de identidade com a região homóloga, região dos <i>amplicons</i> correspondendo ao intervalo da sequência em que os <i>primers</i> anelam, e tamanho do <i>amplicon</i> . Tamanho <i>amplicon</i> SCARs se refere ao	

tamanho do fragmento gerado pelos <i>primers</i> SCARs, ou seja, desenhados como uma extensão do <i>primer</i> RAPD. O tamanho <i>amplicon primers</i> se refere ao fragmento gerado pelos <i>primers</i> desenhados internamente ao segmento sequenciado.....	90
<b>Tabela 11.</b> Lista de <i>primers</i> desenhados a partir dos sequenciamentos de fragmentos RAPD amplificados usando DNA genômico de isolados do complexo de espécies de <i>Ralstonia</i> de diferentes biovares. Os <i>primers</i> SCAR são listados com o prefixo “SCAR”, os demais foram desenhados internamente baseados em polimorfismos visualizados na subtração <i>in silico</i> .....	91
<b>Tabela 12.</b> Condições utilizadas para a PCR e programa do termociclador para uso com os pares de <i>primers</i> J1-B1-B, SCAR-i18-B2A e Sorb-B3.....	94
<b>Tabela 13.</b> Porcentagem de plantas murchas de <i>Coffea arabica</i> ‘Catucaí’, ‘Catucaí Amarelo’ e ‘Catucaí Vermelho’ (média das três cultivares) e de plantas de tomateiro ‘San Vito’ inoculados por imersão de raízes podadas em suspensão bacteriana de nove diferentes isolados de origens e hospedeiras diferentes.....	137

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Aparência de colônias virulentas do complexo de espécies de <i>Ralstonia</i> nos meios de cultura. A – Meio Kelman sem tetrazólio. B – Meio Kelman com tetrazólio. C – Isolado biovar 2A com produção de pigmento marrom. ....	1
<b>Figura 2.</b> Gel de agarose (1%) resultante da eletroforese dos produtos da PCR multiplex com os <i>primers</i> Nmult e o par 759/760 para identificação do filotipo e da espécie dos isolados CNPH-RS 461, CNPH-RS 488 e CNPH-RS 498. Eletroforese com o marcador 1kb <i>plus</i> , <i>amplicon</i> de 372 pb indica o filotipo II. A presença do <i>amplicon</i> de 281 pb confirma que o isolado é do complexo de espécies de <i>Ralstonia</i> .....	42
<b>Figura 3.</b> Titulação de infectividade das linhagens de tomateiro ‘L390’ (suscetível) e ‘Hawaii 7996’ (resistente) avaliadas com cinco concentrações de inóculo de quatro isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i> (CNPH-RS 461, CNPH-RS 488, CNPH-RS 498, CNPH-RS 534). As plantas foram avaliadas dos três até os 16 dias após a inoculação. As cores representam os resultados obtidos com as diferentes concentrações de inóculo. Eixo vertical representa o número absoluto de plantas murchas enquanto o horizontal o número de dias após a inoculação (D.A.I.). O método de Inoculação utilizado foi de borrifamento das raízes com aproximadamente 4 mL de suspensão bacteriana. ....	45
<b>Figura 4.</b> Variação na produção de exopolissacarídeo (EPS) por diferentes isolados do complexo de espécies de <i>Ralstonia</i> . A – Curva de calibração para estimativa da concentração	

de carboidratos totais. B – Médias das estimadas das concentrações de carboidratos totais nos diferentes isolados do complexo de espécies de <i>Ralstonia</i> . Médias seguidas por diferentes letras em cada coluna diferiram estatisticamente, entre si, para o teste de Scott-Knott (5% de probabilidade). .....	47
<b>Figura 5.</b> Quantificação da produção de biofilme por isolados do complexo de espécies de <i>Ralstonia</i> de diferentes filotipos e biovars com análise estatística por teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. ....	48
<b>Figura 6.</b> Porcentagem (incidência) de plantas murchas aos 20 dias após a inoculação de seis hospedeiras (berinjela, tomate, jiló, amendoim, tagetes e gergelim) inoculadas com cinco isolados do complexo de espécies de <i>Ralstonia</i> .....	51
<b>Figura 7.</b> Distribuição dos isolados brasileiros do complexo de espécies de <i>Ralstonia</i> que formaram os <i>bulks</i> contrastantes para as biovars 1, 2A, 2T e 3. Os triângulos verdes indicam os locais de coleta dos isolados da biovar 1, quadrados vermelhos da biovar 2A, quadrados azuis da biovar 2T e círculos pretos indicam isolados da biovar 3. Lista da classificação de biovar, hospedeira original, local e ano de isolamento do conjunto de isolados do complexo de espécies de <i>Ralstonia</i> utilizado no estabelecimento dos <i>bulks</i> contrastantes para as distintas biovars e que foram analisados via <i>Bulked segregant analysis</i> (BSA).....	80
<b>Figura 8.</b> Painel de géis de agarose mostrando o perfil de <i>amplicons</i> resultantes de ensaios de PCR com um conjunto de <i>primers</i> RAPD ( <i>Operon</i> ). Os códigos dos <i>primers</i> empregados estão identificados na parte superior, seguido da biovar do <i>bulk</i> de isolados do complexo de espécies de <i>Ralstonia</i> . Em vermelho estão destacados os <i>amplicons</i> polimórficos.....	87
<b>Figura 9.</b> Géis de agarose após eletroforese das reações de PCR dos 10 DNAs dos isolados do complexo de espécies de <i>Ralstonia</i> que compuseram os quatro <i>bulks</i> das biovars 1, 2A, 2T e 3 com os <i>primers</i> RAPD OP-A7, OP-i18, OP-J1 e OP-K10. A – Segmento do gel de eletroforese da PCR com os <i>bulks</i> com quadrados em azul representando os <i>amplicons</i> exclusivos amplificados. B – Gel de eletroforese da PCR para validação do <i>amplicon</i> verificado no anterior.....	88
<b>Figura 10.</b> Painel de géis de eletroforese em gel de agarose com os produtos de PCR de dez isolados de cada biovar do complexo de espécies de <i>Ralstonia</i> com os pares de <i>primers</i> J1-B1-B, SCAR-i18-B2A e Sorb-B3, ilustrando os níveis de especificidade de cada par. ....	94
<b>Figura 11.</b> Gráfico da análise da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) de 75 genótipos de <i>Solanum peruvianum</i> avaliados quanto sua resistência à murcha bacteriana com os isolados CNPH-RS 488 (raça 3/biovar 2A) e CNPH-RS 489 (raça 1/biovar 1). Os acessos foram comparados com as linhagens ‘Hawaii 7996’ (controle resistente) e ‘L390’ (controle	

suscetível). A barra vermelha indica o resultado da linhagem suscetível ('L390') e em azul o resultado da linhagem resistente ('Hawaii 7996'). Quadros com letras indicam os grupos estatísticos formados pelo teste Scott-Knott ao nível de significância de 5%.....119

**Figura 12.** Plântulas de *Coffea arabica* em estágio de inoculação (com folhas cotiledonares) imersas em suspensão bacteriana de um isolado do complexo de espécies de *Ralstonia*. Foto: C. A. Lopes. ....134

**Figura 13.** Sintomas de murcha bacteriana em plantas de cafeeiro *Coffea arabica*. **(A)** Necrose de uma das folhas cotiledonares; **(B)** Perda de turgidez e brilho da face adaxial foliar; **(C)** Evolução da perda de turgidez seguido de início de necrose da folha; **(D)** Fluxo bacteriano exsudando de caules seccionados de plantas de cafeeiro infectadas e sintomáticas; **(E)** À esquerda uma planta não inoculada e à direita planta inoculada com isolado do complexo de espécies de *Ralstonia* apresentando sintomas de murcha verde também com necrose em folhas mais velhas. Fotos: C. A. Lopes.....138

## RESUMO GERAL

Rossato, Maurício. **Espécies de *Ralstonia* no Brasil: caracterização fenotípica, molecular, novas fontes de resistência em tomateiro e patogenicidade em cafeeiro.** 2016. 165p.

Doutorado em Fitopatologia – Universidade de Brasília, Brasília, DF.

A murcha bacteriana, atualmente reconhecida como sendo causada por um complexo de espécies do gênero *Ralstonia* (*Ralstonia solanacearum*, *R. pseudosolanacearum* e *R. syzygii*) apresenta uma ampla diversidade, podendo ser dividida em raças, biovares, filotipos e sequevares. O objetivo deste trabalho foi: **(i)** ampliar os conhecimentos sobre o importante complexo de espécies de *Ralstonia* por meio da caracterização biológica, bioquímica e molecular do isolado CNPH-RS 488, que se mostrou capaz de suplantar a resistência da linhagem ‘Hawaii 7996’; **(ii)** gerar um novo protocolo de identificação de biovares por meio de técnicas moleculares, visando aumentar a eficiência do processo e reduzir os custos associados com o teste de biovar; **(iii)** identificar novas fontes de resistência em tomateiro à murcha bacteriana em germoplasma selvagem de *Solanum*, considerando o melhoramento antecipatório contra possíveis novas variantes do patógeno, como o isolado CNPH-RS 488; **(iv)** gerar informações sobre o patossistema *Coffea* – *Ralstonia*. No presente estudo, o isolado CNPH-RS 488 foi classificado quanto ao biovar e filotipo, e foram caracterizados o seu perfil de virulência, a capacidade de suplantar de resistência da linhagem ‘Hawaii 7996’, a produção de EPS e de biofilme, bem como a sensibilidade a antibióticos e sua gama de hospedeiras. Os sistemas de marcadores RAPD/SCAR em associação com a estratégia de *bulk segregant analysis* foram inicialmente empregados visando o desenvolvimento de *primers* específicos para identificação de biovares. Para a busca por novas fontes de resistência avaliou-se uma coleção de 75 genótipos de *Solanum peruvianum* em comparação com as linhagens controle ‘Hawaii 7996’ (resistente) e ‘L390’ (suscetível). Os genótipos foram inoculados com os isolados CNPH-RS 488 (biovar 2A) e CNPH-RS 489 (biovar 1). O status do cafeeiro como hospedeira do complexo

de espécies de *Ralstonia* foi demonstrado em bioensaios com nove isolados em três cultivares de *Coffea arabica*, comparando com a resposta do tomateiro suscetível ‘San Vito’. A confirmação da capacidade de suplantação da resistência do ‘Hawaii 7996’ pelo CNPH-RS 488 não pôde ser explicada pelos testes de produção de exopolissacarídeo e biofilme. Foi também constatado que o isolado apresenta uma maior virulência sobre espécies mais resistentes como jiló e berinjela. Onze *primers* RAPD foram selecionados com potencial valor diagnóstico para identificação de biovars. *Amplicons* obtidos com quatro *primers* que geraram marcadores estáveis foram clonados e a informação de sequência foi utilizada para o desenho dos *primers* do tipo SCAR. Os *primers* J1-B1-B e SCAR-i18-B2A apresentaram especificidade parcial para isolados de biovar 1 e 2A, respectivamente. Para a biovar 3, foi empregada uma estratégia de subtração *in silico* que permitiu o desenho de um par de *primers* específico para a região do gene *polS* (codificador da enzima sorbitol desidrogenase). Sete genótipos dos 75 de *S. peruvianum* foram considerados como promissoras fontes para o melhoramento do tomateiro visando à resistência à murcha bacteriana. O cafeeiro se mostrou suscetível exclusivamente a isolados de *R. pseudosolanacearum*, indicando os potenciais riscos que a murcha bacteriana pode apresentar para a cafeicultura brasileira. O presente trabalho destaca que a existência de isolados capazes de suplantar a resistência do tomateiro, como o CNPH-RS 488, e isso implica em potenciais riscos da disseminação dos mesmos pelo país, podendo inviabilizar as cultivares de tomateiro atualmente disponíveis no mercado e que usam a linhagem ‘Hawaii 7996’ como parental. Estudos adicionais sobre esse variante do patógeno serão necessários bem como o desenvolvimento de programas de melhoramento com novas fontes de resistência efetivas contra isolados com um perfil de virulência similar ao apresentado pelo CNPH-RS 488.

**Palavras-chave:** biovars, murcha bacteriana, suplantação de resistência, SCAR, *Solanum peruvianum*.



## GENERAL ABSTRACT

Rossato, Maurício. *Ralstonia* species in Brazil: Phenotypical and molecular characterization, new sources of resistance in tomato and pathogenicity to coffee plants.

2016. 165p. Doctorate in Plant Pathology – Universidade de Brasília, Brasília, DF.

The bacterial wilt is currently recognized as being caused by a complex of three species: *Ralstonia solanacearum*, *R. pseudosolanacearum*, and *R. syzygii*. The causal agents of the bacterial wilt display a wide diversity, being classified in races, biovars, phylotypes, and sequevars. The objective of the present thesis was: **(i)** add new information about this important bacterial complex via biological, biochemical and molecular characterization of the isolate *R. solanacearum* CNPH-RS 488, which was found to be able to break down the resistance of the tomato (*Solanum lycopersicum*) inbred line ‘Hawaii 7996’; **(ii)** develop a new protocol for molecular characterization of biovars, focusing on making a faster and cheaper biovar identification test; **(iii)** search for new sources of resistance to bacterial wilt disease within a germplasm collection of wild *Solanum* (section *Lycopersicon*) species, using the preemptive breeding and developing new resistant cultivar to new and atypical strains like the CNPH-RS 488; **(iv)** study and characterize a new pathosystem: *Coffea* – *Ralstonia*. Studies with the isolate *R. solanacearum* CNPH-RS 488 involved different approaches: **(1)** determination of its biovar and phylotype; **(2)** determination of its virulence profile, including the capability of breaking down the resistance of ‘Hawaii 7996’; **(3)** production of exopolysaccharides (EPS) and biofilm; **(4)** antibiotic sensitivity, and **(5)** host range. The RAPD/SCAR marker systems in association with bulk segregant analysis was the strategy initially employed aiming to develop biovar-specific PCR-based markers. The search for new sources of resistance to bacterial wilt was carried using 75 *Solanum peruvianum* accessions and two standard lines ‘Hawaii 7996’ (resistant) and ‘L390’ (susceptible). Bioassays were carried out with two isolates, CNPH-RS 488 (biovar 2A) and CNPH-RS 489 (biovar 1). For the study of coffee as a host of the *Ralstonia*

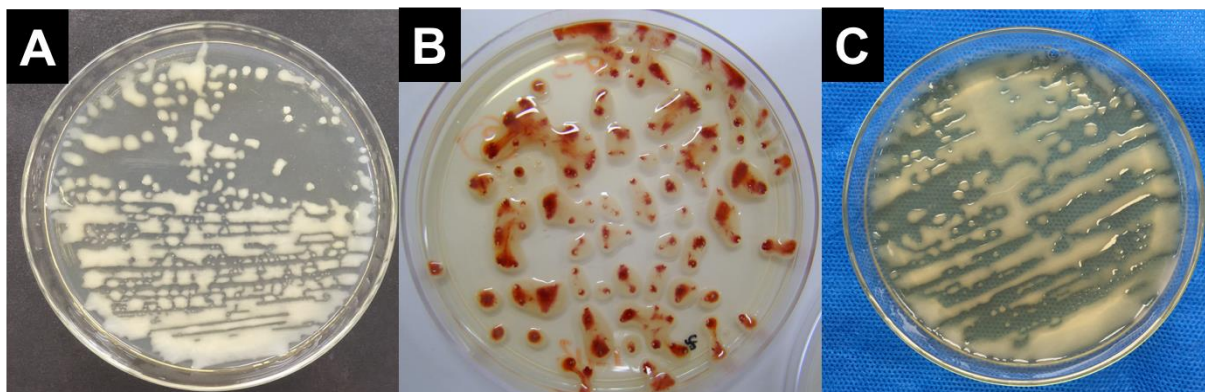
species complex, plants of three *C. arabica* cultivars were inoculated with a collection of nine isolates and their reactions were compared with that of the susceptible standard (tomato ‘San Vito’). The ‘Hawaii 7996’-resistant breaking ability of the isolate CNPH-RS 488 could not be explained by EPS and biofilm production. In addition, it was found that this isolate displayed a wider virulence profile being also able to infect accessions of scarlet eggplant and eggplant (which are naturally more tolerant to bacterial wilt). Eleven RAPD primers with potential diagnostic value for biovar were selected. Four stable amplicons (generated by four RAPD primers) were gel-purified and cloned. The sequence information was used for the design of SCAR-like primers. The primers J1-B1-B and SCAR-i18-B2A displayed partial specificity to isolates biovar 1 and 2A, respectively. For the biovar 3, it was employed the *in silico* subtraction technique, which allowed the design of a *polS* (sorbitol dehydrogenase) gene-specific primer. Seven out of the 75 *S. peruvianum* accessions were considered as promising sources for future use in tomato breeding programs to bacterial wilt resistance. Coffee accessions were susceptible exclusively to *R. pseudosolanacearum* isolates, indicating the potential risk of the bacterial wilt for the Brazilian coffee production. The present work emphasizes the existence of isolates (such as the CNPH-RS 488), which are able to break down the major sources of resistance available in tomato breeding programs. The present work also points out the potential risks of the spread of isolates with similar virulence profile across the country, which may preclude the employment of ‘Hawaii 7996’ as parental material. More studies on these variants will be necessary aiming to help the tomato breeding programs in the search for new sources of resistance to isolates with virulence profiles similar to CNPH-RS 488.

**Keywords:** bacterial wilt, biovars, resistance break, SCAR, *Solanum peruvianum*.

## INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO DE LITERATURA

### 1. O PATÓGENO *Ralstonia solanacearum*

De acordo com a descrição de Denny & Hayward (2001), *Ralstonia solanacearum* (Smith) (Yabuuchi et al., 1995) é uma bactéria bastonetiforme aeróbica, habitante do solo e pertencente à subdivisão  $\beta$  das proteobactérias. A bactéria é gram-negativa, com flagelos polares, catalase e oxidase positiva (com acúmulo de poli- $\beta$ -hidroxibutirato); apresenta nenhum ou pouco crescimento à 40°C, com teste negativo para dihidrolase de arginina, liquefação de gelatina e hidrólise de amido ou esculina. Dois tipos de colônias podem surgir em meio de cultura, uma mais fluída ou mucóide (devido à produção de exopolissacarídeo) e a outra mais seca. Esse segundo tipo de colônia, mais associado à perda de virulência do isolado, quando cultivado em meio Kelman com adição de cloreto de trifenil tetrazólio cora o centro das colônias com uma coloração avermelhada (Kelman, 1954). As colônias não são fluorescentes e podem produzir pigmentos marrons em meio de cultura, em especial isolados da biovar 2A (Figura 1) (Williamson et al., 2002; Horita et al., 2005).



**Figura 1.** Aparência de colônias virulentas do complexo de espécies de *Ralstonia* nos meios de cultura. A – Meio Kelman sem tetrazólio. B – Meio Kelman com tetrazólio. C – Isolado biovar 2A com produção de pigmento marrom.

Recentemente dividida em três espécies, esse complexo de patógenos pode afetar mais de 250 hospedeiras em 54 famílias botânicas (Prior *et al.*, 2016). Existem também outras variantes, como a *Ralstonia syzygii* que pode ser transmitida por inseto vetor e causa a “Sumatra disease” em árvores de cravo, e a “*Blood disease bacterium*”, responsável por uma doença que afeta bananeiras no Velho Mundo (Prior *et al.*, 2016). Essas duas doenças estão ausentes no Brasil.

## 2. TAXONOMIA E HISTÓRICO

O complexo de espécies de *Ralstonia* (CER) foi inicialmente dividido em categorias infraespecíficas, tendo a denominação de raças (Buddenhagen *et al.*, 1962). Essa classificação de raças foge parcialmente do conceito clássico empregado na fitopatologia, uma vez que reflete a capacidade de isolados de infectar diferentes espécies vegetais e não diferentes genótipos/acessos dentro de uma mesma espécie botânica. A raça 1 é patogênica ao fumo, tomate, outras solanáceas e algumas bananas (*Musa* spp.) diplóides; a raça 2 é patogênica às bananas triplóides e heliconiáceas; a raça 3 é patogênica à batata, tomate, mas com baixa agressividade em outras solanáceas; a raça 4 foi reportada afetando o gengibre (*Zingiber officinale* Rosc., família Zingiberaceae) e raça 5, relatada em amora (gênero *Rubus*). As raças 4 e 5 não foram ainda detectadas no Brasil.

A classificação em biovars leva em consideração a capacidade de um isolado em utilizar e/ou oxidar álcoois (dulcitol, manitol e sorbitol) e dissacarídeos (celobiose, lactose e maltose) (Hayward, 1964; Hayward, 1994). As diferentes combinações dos compostos utilizados levam à classificação da biovar de um dado isolado. Variações para isolados de biovar 2 tropicais se caracterizam por apresentarem diferenças na temperatura necessária para indução/manifestação de sintomas, pela medida da atividade pectolítica e pelo consumo de trealose, inositol, D-ribose (Hayward, 1991b). A biovar 2T é caracterizada pela capacidade de infectar uma gama de hospedeiras mais ampla que a da biovar 2A. A biovar 2A é especialmente mais adaptada a

batata, causando sintomas de murcha em temperaturas inferiores a 25°C. Isolados da biovar 2A aparecem, em maiores frequências que outras biovars, em associação com infecções latentes de tubérculos de batata (Hayward, 1991b).

Fegan & Prior (2005) criaram uma nova classificação infraespecífica baseada em informações do genoma de isolados do complexo de espécies de *Ralstonia*. Até o momento, o sistema é composto por quatro filotipos e 57 sequevares (Wicker *et al.*, 2012; Santiago *et al.*, 2016). A classificação atual em filotipos se baseia na variação de tamanho de amplicons gerados da sequência ITS (*intergenic transcribed spacer*) do cromossomo entre os genes de RNA ribossomal 16S e 23S com os *primers* Nmult (Fegan & Prior, 2005). As análises feitas por Fegan & Prior (2005) via PCR multiplex foram validadas por hibridização genômica comparativa (Guidot *et al.*, 2007). As sequevares compõem um nível taxonômico inferior aos filotipos e estão relacionadas com polimorfismos na sequência do gene da endoglucanase (*egl*) (Wicker *et al.*, 2007). No entanto, recombinações que ocorrem com certa frequência na região do gene *egl* podem levar a identificações incorretas de uma sequevar quando somente esse gene é utilizado em análises filogenéticas (Prior & Fegan, 2004; Ivey *et al.*, 2007; Wicker *et al.*, 2012). Desta forma, outros genes têm sido empregados para complementar a análise de sequevares, incluindo os genes *mutS* (proteína de reparo de DNA) e *hrpB* (proteína associada à patogênese e resposta hipersensível).

Recentemente duas novas propostas de divisões da espécie foram feitas. Ambas usaram abordagens distintas e alcançaram resultados similares (**Tabela 1**). A primeira proposta foi elaborada por Remenant *et al.* (2011) que dividiram as espécies usando como base os filotipos. A segunda proposta, feita por Safni *et al.* (2014), considerou a divisão dos filotipos criada por Fegan & Prior (2005) e estudou a evolução do patógeno, demonstrando as similaridades genéticas entre os filotipos I e III pela média de identidade nucleotídica acima dos 95% e agrupando-os em uma nova espécie (*Ralstonia pseudosolanacearum*) (Remenant *et al.* 2011).

A espécie *R. solanacearum* é composta exclusivamente por isolados do filotipo II, com sítio de origem putativo no continente americano (biovar 1, 2A, 2T) (Fegan & Prior, 2005). Isolados do filotipo IV foram classificados como subespécies de *Ralstonia syzygii*, seguindo a recomendação do Código internacional de nomenclatura de procariotos. Desta forma, o nome já aceito de *R. syzygii* foi mantido nesta nova proposta, ao contrário do que foi sugerido por Remenant *et al.* (2011).

A segunda proposta foi mais amplamente aceita pela comunidade científica, em parte por ter sido publicado no periódico mais recomendado para novos tratamentos taxonômicos, o “International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology” (IJSEM) e por ter seguindo as normas estabelecidas pelo Código Internacional de Nomenclatura de Procariotos. Como resultado, diversos trabalhos têm sido publicados usando as novas espécies propostas (Hida *et al.*, 2015; Stulberg & Huang, 2016; Zhang & Qiu, 2016).

**Tabela 1.** Novas propostas de divisão do complexo de espécies do gênero *Ralstonia* elaboradas por dois grupos de pesquisa: Remenant *et al.* (2011) e Safni *et al.* (2014) a partir da divisão previamente proposta por Fegan & Prior (2005).

Classificação Clássica	Fegan & Prior, 2005	Biovar	Remenant <i>et al.</i> , 2011	Safni <i>et al.</i> , 2014
<i>Ralstonia solanacearum</i>	Filotipo I	3, 4, 5	<i>Ralstonia sequeirae</i>	<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>
	Filotipo II	1, 2A, 2T	<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>
	Filotipo III	1, 2T	<i>Ralstonia sequeirae</i>	<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>
	Filotipo IV	1, 2	<i>Ralstonia haywardii</i> subsp. <i>solanacearum</i>	<i>Ralstonia syzygii</i> subsp. <i>indonesiensis</i>
<i>Ralstonia syzygii</i>	Filotipo IV	-	<i>Ralstonia haywardii</i> subsp. <i>syzygii</i>	<i>Ralstonia syzygii</i> subsp. <i>syzygii</i>
<b>BDB</b>	Filotipo IV	-	<i>Ralstonia haywardii</i> subsp. <i>celebensis</i>	<i>Ralstonia syzygii</i> subsp. <i>celebensis</i>

### 3. O GENOMA DO COMPLEXO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Ralstonia*

Um grande avanço nos conhecimentos sobre o CER foi obtido após o sequenciamento completo do genoma completo do isolado GMI1000 (Salanoubat *et al.*, 2002). A partir daí a evolução de técnicas de sequenciamento e a redução de custos permitiram o sequenciamento de mais de 50 genomas completos de diferentes isolados (**Tabela 2**), a maioria ainda em processo de finalização de anotação (*draft*). Entre esses isolados encontram-se representados diferentes filotipos, biovars, raças e sequevars, permitindo diversas análises comparativas com o genoma de referência (Salanoubat *et al.*, 2002; Safni *et al.*, 2014; Prior *et al.*, 2016).

Uma característica do genoma que se mostrou conservada nos isolados do CER analisados é a presença de dois *replicons* circulares constituídos de um cromossomo de 3,7 megabases e um megaplasmídeo de 2,1 megabases (Salanoubat *et al.*, 2002; Genin & Boucher, 2004). O maior *replicon*, também chamado de cromossomo, carrega características clássicas dos genomas bacterianos, associados à origem de replicação e outros genes constitutivos (*housekeeping*). O *replicon* menor apresenta uma presumível origem plasmidial devido à quantidade de genes *repA* próximos ao sítio de replicação.

**Tabela 2.** Lista de isolados do complexo de espécies de *Ralstonia* com genoma sequenciado e suas respectivas características.

Isolado	Filot/Seq	Biovar	Hospedeira	Origem	Acesso
FJAT-1458-avir	1	-	Tomate Assintomático	China	GenBank: AHIX00000000.1
FJAT-91	1	3	Tomate	China	GenBank: AHY000000000
FQY_4	I	3	Solo	China	GenBank: CP004012, CP004013
Rs-09-161	I	3	Berinjela	Índia	GenBank: NZ_CM002757.1, NZ_CM002758.1
Rs-10-244	I	3	Pimenta	Índia	GenBank: NZ_CM002755.1, NZ_CM002756.1
Y45	I	3	Fumo	China	GenBank: AFWL000000000
SD54	I-16	4	Gengibre	China	GenBank: ASQR00000000.2

GMI1000	I-18	3	Tomate	Guiana Francesa	GenBank: NC_003295, NC_003296
NCPPB282	II-2	2	Batata	Colômbia	GenBank: JQSH00000000.1
23-10BR	II-27	2	Batata	Brasil	GenBank: JQOI00000000.1
P673	II-4	1	Epipremnum aureum	Estados Unidos	GenBank: JALO01000000
B50	IIA-24	1	Banana	Brasil	EMBL: PRJEB7421
IBSBF1900	IIA-24	1	Banana	Brasil	EMBL: PRJEB8309
CFBP2957	IIA-36	1	Tomate	Antilhas Francesas	EMBL: FP885897, FP885907
Grenada 9-1	IIA-6	1	Banana	Granada	EMBL: PRJEB7428
UW181	IIA-6	1	Banana da Terra Venezuela		EMBL: PRJEB8309
K60T	IIA-7	1	Tomate	Estados Unidos	EMBL: CAGT01000001
CFIA906	IIB	2	-	-	GenBank: JNVP00000000.3
CFBP3858	IIB-1	2	Batata	Holanda	EMBL: PRJEB8309
IPO1609	IIB-1	2	Batata	Holanda	GenBank: CU914168, CU914166
NCPPB909	IIB-1	2	-	Egito	GenBank: JNGD00000000.1
POPS2	IIB-1	2	-	China	GenBank: JQSI00000000.1
RS2	IIB-1	2	Batata	Bolívia	EMBL: PRJEB8309
UY031	IIB-1	2	Batata	Uruguai	GenBank: NZ_CP012687.1, NZ_CP012688.1
CFBP1416	IIB-3	1	Banana da Terra Costa Rica		EMBL: PRJEB7434
CIP417	IIB-3	1	Banana	Filipinas	EMBL: PRJEB7427
MolK2	IIB-3	1	Banana	Filipinas	GenBank: CAHW01000040
CFBP6783	IIB-4	1	Helicônia	Antilhas Francesas	EMBL: PRJEB7432
IBSBF1503	IIB-4	1	Pepino	Brasil	EMBL: PRJEB7433
Po82	IIB-4	1	Batata	México	GenBank: CP002819, CP002820
UW163	IIB-4	1	Banana da Terra Peru		EMBL: PRJEB7430
CFBP7014	IIB-59	1	Antúrio	Trinidad	EMBL: PRJEB8309



CMR15	III	1	Tomate	Camarões	EMBL: FP885895, FP885896
PSI07	IV	2	Tomate	Indonésia	EMBL: FP885906, FP885891

---

“--” dado não conhecido.

### 3. A DOENÇA

A murcha bacteriana é considerada um fator limitante na produção de diversas culturas, estando amplamente distribuída em regiões tropicais, subtropicais e temperadas do mundo (Hayward, 1991a). É um patógeno cosmopolita que não se restringe a alguns grupos de hospedeiras, podendo afetar plantas daninhas, plantas cultivadas, arbustivas e árvores, tanto monocotiledôneas como dicotiledôneas (Genin & Denny, 2012). No Brasil, a doença foi relatada pela primeira vez por Von Parseval (1922) em plantas de fumo e batata e, atualmente, ocorre em todas as regiões do país (Lopes, 2005). Entre as principais hospedeiras, se encontram as espécies da família Solanaceae (Hayward, 1994), embora várias outras famílias e espécies também sejam afetadas (Malavolta *et al.*, 2008). A doença se caracteriza por induzir sintomas de murcha verde que se manifestam nas horas mais quentes do dia, simulando, inicialmente, uma resposta a um estresse hídrico (Lopes, 2005). Com o desenvolvimento da doença os sintomas de murcha se tornam irreversíveis ou permanentes. O sintoma de murcha pode ser explicado pela ação do patógeno na planta, causando entupimento de vasos xilemáticos tanto pelas células bacterianas como também pela produção de exopolissacarídeos (Saile *et al.*, 1997; Huang & Allen, 2000; Tans-Kersten *et al.*, 2001). Com as perspectivas em relação ao aquecimento global, provavelmente alguns variantes mais adaptados às temperaturas mais elevadas ganharão mais importância e é possível também que venha a se tornar mais destrutivo nas regiões em que ocorre e/ou que passe a causar danos em regiões ainda sem condições ambientais adequadas para seu desenvolvimento (Jeong *et al.*, 2007).

Os cafeeiros (*Coffea* spp.) são um exemplo de espécies hospedeiras que podem ganhar importância quanto suas perdas para a murcha bacteriana (Lopes *et al.*, 2009). A observação da

estreita relação filogenética entre as famílias Rubiaceae e Solanaceae (Lin *et al.*, 2005) estimulou a condução de ensaios para verificar, a nível experimental, a potencial ocorrência do patossistema cafeeiro – *Ralstonia*. Os resultados foram positivos indicando a interação entre isolados do patógeno e as espécies hospedeiras do gênero *Coffea*.

#### **4. CONTROLE E MELHORAMENTO GENÉTICO**

A murcha bacteriana causada pelo CER afeta importante culturas como tomate (*Solanum lycopersicum*), batata (*Solanum tuberosum*), amendoim (*Arachis hypogaea*) e banana (*Musa spp.*) (Elphinstone, 2005), gerando grandes perdas especialmente em condições de cultivo protegido (Lopes, 2015). O controle dessa doença é especialmente complexo devido a uma somatória de características biológicas e epidemiológicas deste grupo de patógenos tais como: sobrevivência por longos períodos no solo (Lin *et al.*, 2009), ampla gama de plantas hospedeiras (Genin & Denny, 2012) e enorme capacidade de dispersão, por material vegetativo, cursos de água, solo contaminado e outros (Hayward, 1991a). A murcha bacteriana causada pelo CER pode obrigar a substituição da espécie cultivada, principalmente em regiões tropicais (Takatsu & Lopes, 1997). Poucas práticas agrícolas resultam em controle eficiente, com exceção do cultivares resistentes, que em geral apresenta alta eficiência de controle, baixo custo, não exigindo conhecimentos extensos do usuário e sendo mais interessante no ponto de vista ecológico (Strange & Scott, 2005; Jianwei *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2013; Hanson *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2016).

A linhagem de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) ‘Hawaii 7996’ tem sido empregada como padrão de resistência à murcha bacteriana e tem sido usada como parental para cruzamentos e diretamente como porta-enxerto (Wang *et al.*, 2013; Lopes *et al.*, 2015). Diversos experimentos têm confirmando sua eficiência contra uma ampla gama de isolados (Wang *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2013). A resistência nessa linhagem apresenta controle genético complexo (poligênico), sendo determinada por diferentes *quantitative trait loci*

(QTLs), localizados em diferentes cromossomos (Wang *et al.*, 1998; Carmeille *et al.*, 2006a; Lebeau *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013).

Mais de 40 genes de resistência já foram usados em programas de melhoramento originários de espécies silvestres do gênero *Solanum* (Rick & Chetelat, 1995). Dessa forma, outras espécies do gênero *Solanum* podem ser potencialmente empregadas no melhoramento visando ampliar a base genética da resistência também contra a murcha bacteriana. Acessos com resistência a essa doença têm também sido identificados em acessos das espécies *S. pennellii* (Hai *et al.*, 2008), *S. pimpinellifolium* (Jaworski *et al.*, 1987) e *S. peruvianum* (Carmeille *et al.*, 2006b).

## 5. PATOGÊNESE

O conhecimento detalhado dos mecanismos de patogênese associados aos patógenos causadores da murcha bacteriana é essencial quando se tem como objetivo o seu controle (Genin & Denny, 2012). Entre os mais importantes fatores de patogênese estão o exopolissacarídeo (EPS), o biofilme e o sistema secretor do tipo III (Danhorn & Fuqua, 2007; Genin & Denny, 2012).

O EPS é secretado para o exterior da célula e exerce várias funções vitais tais, proteção da célula contra agentes externos (ex. antibióticos), proteção contra os sistemas de defesa da planta hospedeira (que podem detectar lipopolissacarídeos ou *pili*) e proteção contra o ressecamento celular (Saile *et al.*, 1997; Murthy & Srinivas, 2015). Outra ação também conhecida do EPS é participar do sintoma de murcha verde, auxiliando no processo de entupimento dos vasos vasculares (Milling *et al.*, 2011). Outras potenciais implicações do EPS na patogênese foram propostas, incluindo a formação de biofilme (Genin & Boucher, 2002; Milling *et al.*, 2011). A rota metabólica mobilizada na produção de EPS é complexa, tendo o

envolvimento de 12 genes presentes em um *operon* de 16 kb (Denny, 1995; Huang & Schell, 1995).

A produção de biofilme é dependente de uma série de outros componentes celulares que podem determinar a velocidade ou a quantidade produzida. O *pili* tipo IV, por exemplo, é necessário para aderência celular necessária para ativar a síntese inicial do biofilme (Kang *et al.*, 2002). O biofilme é composto por um conjunto diversificado de biopolímeros consistindo de polissacarídeos, proteínas, glicoproteínas, glicolipídios e pode também conter DNA extracelular (Flemming *et al.*, 2007). O EPS é um componente importante, determinando a porosidade, a densidade, o conteúdo de água, a carga residual e estabilidade do biofilme (Flemming *et al.*, 2007). O biofilme tem participação na patogênese devido a sua capacidade de aderência ao sistema vascular do xilema. Além disso, o biofilme pode participar da proteção celular, agindo de forma similar ao EPS, protegendo a célula bacteriana de substâncias tóxicas e evitando a detecção da bactéria pelos sistemas de defesa da planta (Bogino *et al.*, 2013).

O sistema secretor do tipo III (SST3) apresenta características peculiares, com ativação pela detecção pela célula bacteriana de secreções externas geralmente de células hospedeiras (Cunnac *et al.*, 2004). O mecanismo de exportação do SST3 é composto por mais de 20 diferentes proteínas, incluindo proteínas citoplasmáticas solúveis, proteínas externas de membrana e proteínas integrantes de membrana (Cunnac *et al.*, 2004).

## **6. MARCADORES MOLECULARES**

Marcadores moleculares são uma ferramenta importante para a pesquisa genética devido a sua capacidade de diferenciar e estudar variações fenotípicas e genotípicas (Moon *et al.*, 2016). Os sistemas de marcadores moleculares (ex. RFLP, RAPD e *primers* específicos) tiveram participação essencial no estudo da diversidade de isolados do CER, possibilitando caracterizar algumas de suas subdivisões (Cook & Sequeira, 1993; Genin & Boucher, 2004;

Prior & Fegan, 2004). A recente popularização dos métodos de sequenciamento de genoma (*next generation sequencing*) como Illumina e PacBio tem fornecido novas ferramentas para análises genéticas/moleculares em larga escala, além de permitirem uma considerável redução de custos (Faure & Joly, 2015).

### **6.1. RAPD**

O sistema de marcadores RAPD (*randomly amplified polymorphic DNA*) ainda é amplamente utilizado na caracterização de microrganismos, em especial de bactérias (Wei *et al.*, 2014; Pal, 2015). Esse sistema de marcadores se baseia na amplificação de regiões que ocorrem no DNA genômico utilizando *primers* curtos (10 nt) de sequência arbitrária (Williams *et al.*, 1990). Somente um *primer* é utilizado para anelar em sítios que flanqueiam regiões alvo (com distância máxima entre os sítios de anelamento de até 4000 nt) ao longo de todo o genoma (Lacerda *et al.*, 2002). De acordo com Williams *et al.* (1990) a variação em apenas uma base no sítio de anelamento do *primer* pode impedir a amplificação do fragmento. Os produtos da amplificação via PCR são separados em gel de agarose ou poliacrilamida. A diferença no número e no tamanho dos *amplicons* pode estar associada com a simples existência de deleções e inserções que ocorrem dentro da região homóloga ao *primer* (Lacerda *et al.*, 2002). O sistema RAPD pode ser associado com outras estratégias como *Bulk segregant analysis* (BSA) ou combinada com outros tipos de marcadores, visando aumentar o conhecimento sobre a variabilidade genética/molecular um determinado organismo.

### **6.2. BULK SEGREGANT ANALYSIS (BSA)**

BSA é uma estratégia geral de análise genética que permite a busca por polimorfismos associados com características qualitativas ou quantitativas (El-Soda *et al.*, 2014; Zou *et al.*, 2016). Essa técnica é sugerida visando reduzir custos e aumentar a eficiência processo de identificação de polimorfismos entre amostras contrastantes (Quarrie *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 2010). A técnica BSA proposta por Michelmore *et al.* (1991) se baseia no agrupamento do DNA

de genótipos que compartilham fenótipos comuns em *pools* ou *bulks* (com os DNAs componentes calibrados com mesma concentração) para serem contrastados com bulks contrastantes pelo uso de diferentes sistemas de marcadores tais como o RAPD. Sun *et al.* (2010) citam que o uso de *bulks* com grandes populações auxilia na identificação de genes, pois ao invés de validar marcadores putativos genotipando uma população inteira, os marcadores candidatos identificados nas etapas iniciais de BSA já têm uma probabilidade maior de serem válidos. Na criação dos *bulks* é recomendado o uso de grupos paralelos e com mesmas características para evitar falsos positivos, então cria-se *bulks* contrastantes, tendo também duplicatas de mesma característica, porém, com indivíduos distintos (Sun *et al.*, 2010; Ghazvini *et al.*, 2013).

### **6.3. SCAR**

A estratégia de marcadores SCAR (*sequence characterized amplified region*) emprega, como informação inicial para geração de *primers* específicos, a sequência de diversos marcadores usados para *fingerprinting* (Holmberg *et al.*, 2009), tais como RAPD (Moon *et al.*, 2016) e BOX-PCR (Rossi *et al.*, 2014). *Amplicons* são purificados e sequenciados, suas sequências são então usadas para desenho de *primers* específicos. Uma das vantagens dos marcadores SCAR é que eles podem ser desenvolvidos para qualquer organismo de interesse até mesmo quando a informação genética não esteja disponível (Felici *et al.*, 2008).

## **7. ANTIBIÓTICOS E MEIOS SEMI-SELETIVOS**

Historicamente os patógenos procariotos têm sido isolados, detectados e caracterizados principalmente pela técnica de meios semi-seletivos (Priou *et al.*, 2006). O meio Kelman foi um dos primeiros descritos para o CER, constituído do meio CPG (caseína, peptona, glicerol) com a suplementação de cloreto de trifetil tetrazólio (Kelman, 1954). O cultivo de isolados do CER no meio Kelman promove uma coloração diferenciada das colônias, o que permite uma pronta seleção de variantes dessa bactéria. Outros meios diferenciais foram desenvolvidos

visando solucionar o problema de isolamento seletivo de componentes do CER de solo (Engelbrecht, 1994). A adição de antibióticos promove uma supressão do desenvolvimento de outros organismos “contaminantes”, permitindo um número restrito de espécies crescer no meio. Esses meios foram desenvolvidos levando em consideração apenas diversidade local/regional ou usando um número pequeno e pouco representativo de isolados do CER. Dessa forma, quando o meio é avaliado com outros conjuntos de isolados, pode ocorrer a supressão dos mesmos, tornando o meio ineficaz para uma detecção “universal” de subgrupos do patógeno. Essa baixa cobertura da diversidade do CER demanda uma adequação dos meios para outros isolados. Testes de antibiograma visando avaliar novos antibióticos ou estimar os limites de concentração de antibióticos para novos meios de cultura ainda são escassos (**Tabela 3**).

**Tabela 3.** Lista de meios de cultura semi-seletivos, ano de desenvolvimento, seus respectivos componentes e antibióticos empregados.

Meio	Ano	Composição	Referencia
SM-1	1983	Cristal violeta Thimerosal Polimixina B Tyrothricin Clhoromycetin Ciclohexamida	Rica, Costa. Plant Disease 67.10 (1983): 1084-1088.
SMSA-M	1996	Bacitracina Polimixina B Cloranfenicol Penicilina Cristal violeta Cloreto de trifenil tetrazólio	Elphinstone JG, Hennessy J, Wilson JK, Stead DE, 1996. Sensitivity of different methods for the detection of <i>Pseudomonas solanacearum</i> (Smith) in potato tuber extracts. EPPO Bulletin 26, 663–78.
CIPEB	2006	Polimixina B Bacitracina Penicilina Cloranfenicol Ciclohexamida Cristal violeta Cloreto de trifenil tetrazólio Vitamina C	Priou, S., L. Gutarra, and P. Aley. "An improved enrichment broth for the sensitive detection of <i>Ralstonia solanacearum</i> (biovars 1 and 2A) in soil using DAS–ELISA." Plant Pathology 55.1 (2006): 36-45.
SMSA-P	2010	Piruvato Bacitracina Polimixina B Cloranfenicol Penicilina Cristal violeta Cloreto de trifenil tetrazólio	Imazaki, Iori, and Kazuhiro Nakaho. "Pyruvate-amended modified SMSA medium: improved sensitivity for detection of <i>Ralstonia solanacearum</i> ." Journal of general plant pathology 76.1 (2010): 52-61.

## 8. OBJETIVOS

### 8.1. OBJETIVO GERAL

- Ampliar os conhecimentos sobre o complexo de espécies de *Ralstonia* por meio de estudos de plantas hospedeiras, novas fontes de resistência em tomateiro, fatores e perfil de virulência e desenvolver um novo e mais simplificado protocolo para identificação de biovars.



## 8.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar os potenciais mecanismos de virulência de um isolado atípico de *R. solanacearum* (denominado de CNPH-RS 488), que se mostrou capaz de superar a resistência da linhagem de tomateiro ‘Hawaii 7996’;
- Desenvolver protocolo molecular para identificação de biovars usando *primers* específicos para cada uma das quatro biovars presentes no Brasil (1, 2A, 2T & 3);
- Buscar acessos de *S. peruvianum* com potencial uso no melhoramento genético do tomateiro visando resistência a murcha bacteriana;
- Caracterizar a espécie *Coffea arabica* como uma potencial hospedeira experimental do complexo de espécies de *Ralstonia*.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOGINO, P.C.; OLIVA, M.D.L.M.; SORROCHE, F.G. & GIORDANO, W. 2013. The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations. *International Journal of Molecular Sciences* 14:15838-15859.
- BUDDENHAGEN, I.W.; SEQUEIRA, L. & KELMAN, A. 1962. Designation of races of *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 52:726-730.
- CARMEILLE, A.; CARANTA, C.; DINTINGER, J.; PRIOR, P.; LUISETTI, J. & BESSE, P. 2006a. Identification of QTLs for *Ralstonia solanacearum* race 3-phyloptype II resistance in tomato. *Theoretical and Applied Genetics* 113:110-121.
- CARMEILLE, A.; PRIOR, P.; KODJA, H.; CHIROLEU, F.; LUISETTI, J. & BESSE, P. 2006b. Evaluation of resistance to race 3, biovar 2 of *Ralstonia solanacearum* in tomato germplasm. *Journal of Phytopathology* 154:398-402.
- COOK, D. & SEQUEIRA, L. Strain differentiation of *Pseudomonas solanacearum* by molecular genetic methods. *Proceedings of the aciar proceedings, 1993: australian centre for international agricultural research*, 96-96.
- CUNNAC, S.; OCCHIALINI, A.; BARBERIS, P.; BOUCHER, C. & GENIN, S. 2004. Inventory and functional analysis of the large Hrp regulon in *Ralstonia solanacearum*: identification of novel effector proteins translocated to plant host cells through the type III secretion system. *Molecular Microbiology* 53:115-128.

- DANHORN, T. & FUQUA, C. 2007. Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annual Reviews of Microbiology* 61:401-422.
- DENNY, T.P. 1995. Involvement of bacterial polysaccharides in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology* 33:173-197.
- DENNY, T.P. & HAYWARD, A.C. 2001. Gram-negative bacteria - *Ralstonia*. In: SCHAAD, N.; JONES, J.B. & CHUN, W. eds. *Laboratory Guide for identification of plant pathogenic bacteria*. 3 ed. APS Press. Estados Unidos. p. 151-174.
- EL-SODA, M.; MALOSETTI, M.; ZWAAN, B.J.; KOORNNEEF, M. & AARTS, M.G.M. 2014. Genotype × environment interaction QTL mapping in plants: lessons from *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science* 19:390-398.
- ELPHINSTONE, J.G. 2005. 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*. 1 ed. APS Press. Estados Unidos. p. 9-28.
- ENGELBRECHT, M.C. 1994. Modification of a semi-selective medium for the isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum*. *Bacterial Wilt Newsletter*:3-5.
- FAURE, D. & JOLY, D. 2015. Next-generation sequencing as a powerful motor for advances in the biological and environmental sciences. *Genetica* 143:129-132.
- FEGAN, M. & PRIOR, P. 2005. 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*. 1 ed. APS Press. Estados Unidos. p. 449-461.
- FELICI, C.; VETTORI, L.; TOFFANIN, A. & NUTI, M. 2008. Development of a strain-specific genomic marker for monitoring a *Bacillus subtilis* biocontrol strain in the rhizosphere of tomato. *FEMS microbiology ecology* 65:289-298.
- FLEMMING, H.-C.; NEU, T.R. & WOZNIAK, D.J. 2007. The EPS matrix: the “house of biofilm cells”. *Journal of Bacteriology* 189:7945-7947.
- GENIN, S. & BOUCHER, C. 2002. *Ralstonia solanacearum*: secrets of a major pathogen unveiled by analysis of its genome. *Molecular Plant Pathology* 3:111-118.
- GENIN, S. & BOUCHER, C. 2004. Lessons learned from the genome analysis of *Ralstonia solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology* 42:107-134.
- GENIN, S. & DENNY, T.P. 2012. Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum species complex*. *Annual Review of Phytopathology* 50:67-89.
- GHAZVINI, H.; HIEBERT, C.W.; THOMAS, J.B. & FETCH, T. 2013. Development of a multiple bulked segregant analysis (MBSA) method used to locate a new stem rust

- resistance gene (Sr54) in the winter wheat cultivar Norin 40. *Theoretical and Applied Genetics* 126:443-449.
- GUIDOT, A.; PRIOR, P.; SCHOENFELD, J.; CARRÈRE, S.; GENIN, S. & BOUCHER, C. 2007. Genomic structure and phylogeny of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from gene distribution analysis. *Journal of Bacteriology* 189:377-387.
- HAI, T.T.H.; ESCH, E. & WANG, J.-F. 2008. Resistance to Taiwanese race 1 strains of *Ralstonia solanacearum* in wild tomato germplasm. *European Journal of Plant Pathology* 122:471-479.
- HANSON, P.; LU, S.-F.; WANG, J.-F.; CHEN, W.; KENYON, L.; TAN, C.-W.; TEE, K.L.; WANG, Y.-Y.; HSU, Y.-C. & SCHAFLEITNER, R. 2016. Conventional and molecular marker-assisted selection and pyramiding of genes for multiple disease resistance in tomato. *Scientia Horticulturae* 201:346-354.
- HAYWARD, A. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology* 27:265-277.
- HAYWARD, A.C. 1991a. Biology and Epidemiology of a bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology* 29:14.
- HAYWARD, A.C. 1991b. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology* 29:65-87.
- HAYWARD, A.C. 1994. The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. In: HAYWARD, A.C. & HARTMAN, G.L. eds. *Pseudomonas solanacearum: The disease and its causative agent*. 1 ed. CABI International. Reino Unido. p. 101-115.
- HIDA, A.; OKU, S.; KAWASAKI, T.; NAKASHIMADA, Y.; TAJIMA, T. & KATO, J. 2015. Identification of the mcpA and mcpM genes, encoding methyl-accepting proteins involved in amino acid and i-malate chemotaxis, and involvement of mcpm-mediated chemotaxis in plant infection by *Ralstonia pseudosolanacearum* (formerly *Ralstonia solanacearum* phylotypes I and III). *Applied and Environmental Microbiology* 81:7420-7430.
- HOLMBERG, A.-I.J.; MELIN, P.; LEVENFORS, J.P. & SUNDH, I. 2009. Development and evaluation of SCAR markers for a *Pseudomonas brassicacearum* strain used in biological control of snow mould. *Biological Control* 48:181-187.
- HORITA, M.; TSUCHIYA, K. & OOSHIRO, A. 2005. Characteristics of *Ralstonia solanacearum* biovar N2 strains in Asia. *Journal of Phytopathology* 153:209-213.
- HUANG, J. & SCHELL, M. 1995. Molecular characterization of the eps gene cluster of *Pseudomonas solanacearum* and its transcriptional regulation at a single promoter. *Molecular microbiology* 16:977-989.

- HUANG, Q. & ALLEN, C. 2000. Polygalacturonases are required for rapid colonization and full virulence of *Ralstonia solanacearum* on tomato plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 57:77-83.
- IVEY, M.L.L.; GARDENER, B.B.M.; OPINA, N. & MILLER, S.A. 2007. Diversity of *Ralstonia solanacearum* infecting eggplant in the Philippines. *Phytopathology* 97:1467-1475.
- JAWORSKI, C.A.; PHATAK, S.C.; GHATE, S.R.; GITAITIS, R.D. & WIDRLECHNER, M.P. 1987. Ga 1565-2-4 Bwt, Ga 219-1-2 Bwt, Ga 1095-1-4 Bwt, And Ga 1405-1-2 Bwt bacterial wilt-tolerant tomato. *HortScience (USA)* 22:324-325.
- JEONG, Y.; KIM, J.; KANG, Y.; LEE, S. & HWANG, I. 2007. Genetic diversity and distribution of Korean isolates of *Ralstonia solanacearum*. *Plant Disease* 91:1277-1287.
- JIANWEI, L.; HUIFANG, J.; XIAOPING, R.; XIAOJIE, Z. & BOSHOU, L. 2010. Identification and molecular traits of ICRISAT mini core collection of peanut species with resistance to bacterial wilt. *Chinese Agriculture Science Bulletin* 26:47-51.
- KANG, Y.; LIU, H.; GENIN, S.; SCHELL, M.A. & DENNY, T.P. 2002. *Ralstonia solanacearum* requires type 4 pili to adhere to multiple surfaces and for natural transformation and virulence. *Molecular Microbiology* 46:427-437.
- KELMAN, A. 1954. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology* 44:693-695.
- LACERDA, D.R.; ACEDO, M.D.P.; LEMOS FILHO, J.P.D. & LOVATO, M.B. 2002. A técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas. *Lundiana* 3:87-92.
- LEBEAU, A.; DAUNAY, M.C.; FRARY, A.; PALLOIX, A.; WANG, J.F.; DINTINGER, J.; CHIROLEU, F.; WICKER, E. & PRIOR, P. 2011. Bacterial wilt resistance in tomato, pepper, and eggplant: genetic resources respond to diverse strains in the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Phytopathology* 101:154-165.
- LIN, C.; MUELLER, L.A.; MC CARTHY, J.; CROUZILLAT, D.; PETIARD, V. & TANKSLEY, S.D. 2005. Coffee and tomato share common gene repertoires as revealed by deep sequencing of seed and cherry transcripts. *Theoretical and Applied Genetics* 112:114-130.
- LIN, C.-H.; HSU, S.-T.; TZENG, K.-C. & WANG, J.-F. 2009. Detection of race 1 strains of *Ralstonia solanacearum* in field samples in Taiwan using a BIO-PCR method. *European Journal of Plant Pathology* 124:75-85.
- LOPES, C.A. 2005. Murchadeira da batata. 1 Ed. Associação Brasileira da Batata. Itapetininga.

- LOPES, C.A. 2015. Bacterial Wilt - a disease threatening disease of tomato cultivated under warm temperatures. Comunicado Técnico 109:4.
- LOPES, C.A.; BOITEUX, L.S. & ESCHEMBACK, V. 2015. Eficácia relativa de porta-enxertos comerciais de tomateiro no controle da murcha-bacteriana. Horticultura Brasileira 33:125-130.
- LOPES, C.A.; ROSSATO, M. & BOITEUX, L.A. 2009. Murcha-bacteriana: nova ameaça à cafeicultura brasileira. In. Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. Vitória: Embrapa Café.
- MALAVOLTA, J.; BERIAM, L.; ALMEIDA, I.; RODRIGUES NETO, J. & ROBBS, C. 2008. Bactérias fitopatogênicas assinaladas no Brasil: uma atualização. Summa Phytopathologica 34:9-87.
- MICHELMORE, R.W.; PARAN, I. & KESSELI, R.V. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 88:9828-9832.
- MILLING, A.; BABUJEE, L. & ALLEN, C. 2011. *Ralstonia solanacearum* extracellular polysaccharide is a specific elicitor of defense responses in wilt-resistant tomato plants. PloS One 6:e15853.
- MOON, B.C.; LEE, Y.M.; KIM, W.J.; JI, Y.; KANG, Y.M. & CHOI, G. 2016. Development of molecular markers for authentication of the medicinal plant species *Patrinia* by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis and multiplex-PCR. Horticulture, Environment, and Biotechnology 57:182-190.
- MURTHY, K.N. & SRINIVAS, C. 2015. Extraction and characterization of extracellular polysaccharide from *Ralstonia solanacearum* causing wilt of tomato. International Journal of Agricultural Science and Research (IJASR) 5:81-92.
- PAL, P. 2015. RAPD-PCR as a molecular discriminative technique for human pathogenic bacteria-A Review. International Letters of Natural Sciences 42:13-17.
- PEETERS, N.; CARRÈRE, S.; ANISIMOVA, M.; PLENER, L.; CAZALÉ, A.-C. & GENIN, S. 2013. Repertoire, unified nomenclature and evolution of the Type III effector gene set in the *Ralstonia solanacearum* species complex. BMC Genomics 14:859-877.
- PRIOR, P.; AILLOUD, F.; DALRING, B.L.; REMENANT, B.; SANCHEZ, B. & ALLEN, C. 2016. Genomic and proteomic evidence supporting the division of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* into three species. BMC Genomics 17:90-101.
- PRIOR, P. & FEGAN, M. Recent developments in the phylogeny and classification of *Ralstonia solanacearum*. Proceedings of the I International Symposium on Tomato Diseases 695, 2004, 127-136.

- PRIOU, S.; GUTARRA, L. & ALEY, P. 2006. An improved enrichment broth for the sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* (biovars 1 and 2A) in soil using DAS–ELISA. *Plant Pathology* 55:36-45.
- QUARRIE, S.A.; LAZIĆ-JANČIĆ, V.; KOVAČEVIĆ, D.; STEED, A. & PEKIĆ, S. 1999. Bulk segregant analysis with molecular markers and its use for improving drought resistance in maize. *Journal of Experimental Botany* 50:1299-1306.
- REMENANT, B.; DE CAMBIAIRE, J.-C.; CELLIER, G.; JACOBS, J.M.; MANGENOT, S.; BARBE, V.; LAJUS, A.; VALLENET, D.; MEDIGUE, C. & FEGAN, M. 2011. *Ralstonia syzygii*, the blood disease bacterium and some Asian *R. solanacearum* strains form a single genomic species despite divergent lifestyles. *PloS One* 6:e24356-e24356.
- RICK, C.M. & CHETELAT, R.T. Utilization of related wild species for tomato improvement. *Proceedings of the I International Symposium on Solanacea for Fresh Market* 412, 1995, 21-38.
- ROSSI, C.C.; PEREIRA, M.F.; LANGFORD, P.R. & BAZZOLLI, D.M.S. 2014. A BOX-SCAR fragment for the identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *FEMS Microbiology Letters* 352:32-37.
- SAFNI, I.; CLEENWERCK, I.; DE VOS, P.; FEGAN, M.; SLY, L. & KAPPLER, U. 2014. Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. and *R. solanacearum* phylotype I and III strains as *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64:3087-3103.
- SAILE, E.; MCGARVEY, J.A.; SCHELL, M.A. & DENNY, T.P. 1997. Role of extracellular polysaccharide and endoglucanase in root invasion and colonization of tomato plants by *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology* 87:1264-1271.
- SALANOUBAT, M.; GENIN, S.; ARTIGUENAVE, F.; GOUZY, J.; MANGENOT, S.; ARLAT, M.; BILLAULT, A.; BROTTIER, P.; CAMUS, J. & CATTOLICO, L. 2002. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature* 415:497-502.
- SANTIAGO, T.R.; LOPES, C.A.; CAETANO- ANOLLÉS, G. & MIZUBUTI, E.S.G. 2016. Phylotype and sequevar variability of *Ralstonia solanacearum* in Brazil, an ancient center of diversity of the pathogen. *Plant Pathology*.
- SMITH, E.F. 1886. A bacterial disease of tomato, eggplant and Irish potato (*Bacillus solanacearum* sp nov.). *Department of Agriculture Division of Vegetable Physiology and Pathology Bulletin* 12:7.

- STRANGE, R.N. & SCOTT, P.R. 2005. Plant disease: a threat to global food security. *Phytopathology* 43:83-116.
- STULBERG, M.J. & HUANG, Q. 2016. A computer program for fast and easy typing of a partial endoglucanase gene sequence into genospecies and sequevars 1&2 of the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Journal of Microbiological Methods* 123:101-107.
- SUN, Y.; WANG, J.; CROUCH, J.H. & XU, Y. 2010. Efficiency of selective genotyping for genetic analysis of complex traits and potential applications in crop improvement. *Molecular Breeding* 26:493-511.
- TAKATSU, A. & LOPES, C.A. 1997. Murcha bacteriana em hortaliças: avanços científicos e perspectivas de controle. *Horticultura Brasileira* 15:170-177.
- TANS-KERSTEN, J.; HUANG, H. & ALLEN, C. 2001. *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. *Journal of Bacteriology* 183:3597-3605.
- VON PARSEVAL, M. 1922. Uma doença do fumo e da batata inglesa no município de Santa Cruz. *Boletim do Instituto Borges de Medeiros* 1:15.
- WANG, J.-F.; HO, F.-I.; TRUONG, H.T.H.; HUANG, S.-M.; BALATERO, C.H.; DITTAPONGPITCH, V. & HIDAYATI, N. 2013. Identification of major QTLs associated with stable resistance of tomato cultivar 'Hawaii 7996' to *Ralstonia solanacearum*. *Euphytica* 190:241-252.
- WANG, J.F.; HANSON, P. & BARNES, J.A. 1998. Worldwide evaluation of an international set of resistance sources to bacterial wilt in tomato. *In: PRIOR, P.; ALLEN, C. & ELPHINSTONE, J. eds. Bacterial Wilt Disease*. 1 ed. Springer. Alemanha. p. 269-275.
- WEI, L.S.; MUSA, N.; WEEL, W.; SENG, C.T.; SHAZILI, N.A.M. & SHAHAROM, F. 2014. Review on RAPD-PCR as a Discriminative Tool for Fish Bacteria. *Chinese papers* 5:10-19.
- WICKER, E.; GRASSART, L.; CORANSON-BEAUDU, R.; MIAN, D.; GUILBAUD, C.; FEGAN, M. & PRIOR, P. 2007. *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential. *Applied and Environmental Microbiology* 73:6790-6801.
- WICKER, E.; LEFEUVRE, P.; DE CAMBIAIRE, J.-C.; LEMAIRE, C.; POUSSIER, S. & PRIOR, P. 2012. Contrasting recombination patterns and demographic histories of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from MLSA. *The ISME Journal* 6:961-974.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A. & TINGEY, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18:6531-6535.

- WILLIAMSON, L.; NAKAHO, K.; HUDELSON, B. & ALLEN, C. 2002. *Ralstonia solanacearum* race 3, biovar 2 strains isolated from geranium are pathogenic on potato. *Plant Disease* 86:987-991.
- YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; YANO, I.; HOTTA, H. & NISHIUCHI, Y. 1995. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal of *Ralstonia picketti* (Ralston, Palleroni and Douderoff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1986) comb. nov. & *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. *Microbiology and Immunology* 39:7.
- ZHANG, Y. & QIU, S. 2016. Phylogenomic analysis of the genus *Ralstonia* based on 686 single-copy genes. *Antonie van Leeuwenhoek* 109:71-82.
- ZHAO, Y.; ZHANG, C.; CHEN, H.; YUAN, M.; NIPPER, R.; PRAKASH, C.S.; ZHUANG, W. & HE, G. 2016. QTL mapping for bacterial wilt resistance in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Molecular Breeding* 36:1-11.
- ZOU, C.; WANG, P. & XU, Y. 2016. Bulk sample analysis in genetics, genomics and crop improvement. *Plant Biotechnology Journal* 14:1941-1955.



# CAPÍTULO 1

---

---

**CARACTERIZAÇÃO DE UM ISOLADO DE *Ralstonia solanacearum*  
CAPAZ DE SUPERAR A RESISTÊNCIA DA LINHAGEM DE  
TOMATEIRO (*Solanum lycopersicum*) ‘HAWAII 7996’**

**Caracterização de um isolado de *Ralstonia solanacearum* capaz de superar a resistência da  
linhagem de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) ‘Hawaii 7996’**

**RESUMO**

O complexo de espécies de *Ralstonia* (CER) é uma grande ameaça à cultura do tomateiro, podendo causar grandes perdas. O emprego de cultivares com resistência genética é um dos principais métodos de controle da doença no tomateiro, porém a principal fonte de resistência (a linhagem *Solanum lycopersicum* ‘Hawaii 7996’) teve sua resistência quebrada por um isolado (denominado CNPH-RS 488) no Estado do Paraná em 2012. O presente capítulo apresentou como objetivo a caracterização e elucidação dos potenciais mecanismos de virulência desse isolado. O isolado CNPH-RS 488 foi identificado como pertencente à raça 3, biovar 2A, filotipo II, sequevar 1. Em testes de patogenicidade, o isolado CNPH-RS 488 foi o único dentre os isolados da biovar 2A capaz de causar murcha em todas as plantas de ‘Hawaii 7996’. Na titulação da pressão de inóculo (infectividade) a concentração de  $10^8$  ufc/mL se destacou, permitindo uma elevada incidência de plantas sintomáticas nas linhagens ‘Hawaii 7996’ e ‘L390’ com todos os isolados empregados. Foi também verificado que nas duas maiores concentrações o isolado CNPH-RS 488 causou murcha das plantas mais rapidamente um maior número de plantas ‘Hawaii 7996’ que os demais isolados. A quantidade de exopolissacarídeo produzido pelos isolados não se mostrou alta e diretamente correlacionada com maior ou menor virulência em tomateiro. Similar tendência foi observada em relação à produção de biofilme, com o CNPH-RS 488 fazendo parte, para essa característica, do mesmo grupo de isolados de baixa e média virulência. Apenas os isolados pertencentes à biovar 3 foram capazes de crescer no meio semi-seletivo SMART, não sendo observado o desenvolvimento de isolados das biovars 1, 2A e 2T. Desta forma, esse meio não é recomendado seu uso para isolados brasileiros do CER. O antibiograma com um painel de 16 diferentes antibióticos indica a possibilidade do desenvolvimento de um meio usando oxacilina e clindamicina, associados a

outros antibióticos para o isolamento seletivo de patógenos pertencentes ao CER. No estudo de gama de hospedeiras com as espécies amendoim (*Arachis hypogaea*), tagetes (*Tagetes patula*), jiló (*Solanum aethiopicum* var. *gilo*), berinjela (*S. melongena*) e gergelim (*Sesamun indicum*), foi possível verificar que o isolado CNPH-RS 488 é capaz de causar doença em jiló e berinjela, hospedeiras consideradas de maior resistência a biovar 2A.

**Palavras-chave:** biofilme, exopolissacarídeo, hospedeiros.

**Characterization of a *Ralstonia solanacearum* isolate capable of breaking down the resistance of the tomato (*Solanum lycopersicum*) line ‘Hawaii 7996’**

**ABSTRACT**

The *Ralstonia* species complex is a great threat for the tomato crop, which may cause potential economic and quality losses. The deployment of cultivars with genetic resistance is one of the main methods of control available. However, the resistance of the inbred line ‘Hawaii 7996’ (one of the most employed resistant germplasm sources) was broken down by the *R. solanacearum* CNPH-RS 488 isolate, collected from Paraná State in 2012. The main objectives of the present work were to characterize this isolate and to investigate its putative virulence mechanisms. CNPH-RS 488 was identified as race 3/biovar 2A, phylotype II, and sequevar I. In pathogenicity tests, *R. solanacearum* CNPH-RS 488 was the only isolate of the biovar 2A group capable of causing wilt in all ‘Hawaii 7996’ plants. With the inoculum pressure (infection) titrating, the concentration of  $10^8$  cfu/mL was found to be the most efficient on inducing wilt symptoms. This concentration allowed all the isolates to induce higher levels of incidence on both standard tomato lines. It was verified that the isolate CNPH-RS 488 on the two highest concentrations could wilt a higher number of ‘Hawaii 7996’ and it also induced faster symptom onset than other isolates. The amount of exopolysaccharide produced by the isolates did not strongly correlate with virulence levels on tomato. A similar result was found in relation to biofilm formation. The isolate CNPH-RS 488 did not group with the isolates with high virulence. The semi-selective medium SMART did not allow the development of isolates from the biovars 1, 2A and 2T. Only biovar 3 isolates could develop normally. Therefore, the SMART medium is not recommended for isolation of Brazilian isolates of *Ralstonia* species complex. The antibiogram with a panel of 16 antibiotics showed the possibility of development of a semi-selective medium for *Ralstonia* species isolation using oxacilin and clindamicin, associated to other commonly used antibiotics. In the host range studies employing peanut

(*Arachis hypogaea*), marigold (*Tagetes patula*), scarlet eggplant (*Solanum aethiopicum* var. *gilo*), eggplant (*S. melongena*), and sesame (*Sesamun indicum*), it was possible to confirm that the isolate CNPH-RS 488 is also capable of infecting scarlet eggplant and eggplant, two hosts with higher resistance levels to biovar 2A isolates.

**Keywords:** biofilm, exopolysaccharide, host range.

## 1. INTRODUÇÃO

*Ralstonia solanacearum* (Smith) (Yabuuchi *et al.*, 1995) é uma bactéria gram-negativa habitante do solo com capacidade de infectar uma ampla gama de hospedeiras em mais de 50 famílias botânicas (Kelman, 1954; Hayward, 1991; Hayward, 1994; Plener *et al.*, 2012). *Ralstonia solanacearum* foi recentemente subdividida em três espécies, podendo ser chamada também de complexo de espécies de *Ralstonia* (CER). Os isolados de CER estão distribuídos no mundo inteiro onde causam a murcha bacteriana, uma das doenças mais destrutivas do mundo (Genin & Denny, 2012).

As bactérias do CER iniciam o processo de infecção por meio da penetração na planta hospedeira por ferimentos, aberturas naturais ou pontos de emergência de raízes e se desenvolvem nos espaços intercelulares até alcançar os vasos do xilema (Hayward, 1991; Yao & Allen, 2007). No tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.), os isolados de CER induzem típicos sintomas de murcha verde, resultante do entupimento do xilema e também da necrose dos vasos. As grandes perdas econômicas causadas por essa doença se devem aos sintomas de murcha irreversível e morte das plantas, que ocorrem especialmente durante o período de frutificação (Lopes, 2005). No Brasil, a murcha bacteriana é considerada um dos principais problemas fitossanitários do cultivo do tomateiro e outras solanáceas em condições de cultivo protegido e é o principal fator limitante para produção de tomate na região amazônica (Lopes, 2015).

Devido a sua enorme diversidade, os patógenos pertencentes ao CER têm sido classificados em cinco raças (Buddenhagen *et al.*, 1962), cinco biovars (Hayward, 1991), quatro filotipos e 57 sequevars (Fegan & Prior, 2005; Wicker *et al.*, 2012; Santiago *et al.*, 2016). Uma proposta alternativa (definindo patotipos e perfis patogênicos) foi elaborada visando auxiliar no processo de seleção de isolados representativos para uso em programas de melhoramento de tomateiro, pimentas e pimentões (*Capsicum* spp.) e berinjela (*Solanum melongena*) (Lebeau *et al.*, 2011). Além disso, foram identificados cinco grandes tipos de

isolados ecologicamente similares ou ecotipos (“moko”, “podridão marrom”, “isolados de amora”, “isolados que afetam gengibre” e “isolados emergentes”). Esses ecotipos se caracterizam por compartilharem os tipos de sintomas induzidos, as hospedeiras e outras características bioquímicas e ecológicas (Cohan, 2006; Wicker *et al.*, 2012).

Existe também a proposta de divisão do CER em distintas espécies, levando em consideração a variabilidade presente entre os diferentes filotipos. Os isolados do filotipo II foram identificados como pertencentes à espécie *R. solanacearum*. Por sua vez, os isolados dos filotipos I e III foram classificados como pertencentes a uma nova espécie, denominada de *R. pseudosolanacearum*. Os isolados do filotipo IV foram classificados como pertencentes à espécie *R. syzygii* (Safni *et al.*, 2014). Mais recentemente, Zhang & Qiu (2016) sugeriram a divisão de *R. solanacearum* e de *R. pseudosolanacearum* em duas subespécies cada uma, buscando uma melhor catalogação da diversidade desses patógenos.

A elucidação dos mecanismos de patogênese é essencial para entender tanto o processo de suplantação quanto de estabilidade da resistência do tomateiro aos isolados pertencentes ao CER. A produção de exopolissacarídeo (EPS) (Murthy & Srinivas, 2015), a formação de biofilme (Mori *et al.*, 2015) e a variabilidade do sistema secretor do tipo III (SST3) (Valls *et al.*, 2006) são alguns dos mecanismos de patogênese caracterizados nesse complexo bacteriano. Além disso, a caracterização detalhada desses mecanismos pode fornecer informações cruciais, visando elucidar os fatores associados com a vasta gama de plantas hospedeiras desse grupo de patógenos (Genin, 2010), a resistência/suscetibilidade apresentada por alguns acessos e variedades dentro das espécies hospedeiras, bem como os diferentes atributos ecológicos, fisiológicos, bioquímicos e moleculares deste complexo bacteriano.

O EPS, por exemplo, é o mecanismo associado com a proteção da integridade da célula bacteriana, impedindo as ações de defesa da planta, o contato com antibióticos e evitando o

ressecamento (Murthy & Srinivas, 2015). Em acessos resistentes de tomateiro (ex. *Solanum lycopersicum* ‘Hawaii 7996’) o EPS pode ser identificado/percebido pelos sistemas de defesa da célula hospedeira e funcionar como um MAMP (*microbe associated molecular pattern*), elicitando a resposta de resistência (Milling *et al.*, 2011).

O biofilme, composto majoritariamente pelo EPS e, em parte, por outros componentes celulares, já foi o foco de diversos estudos. Genes e mecanismos celulares necessários para início da formação do biofilme têm sido investigados, não existindo um enfoque de relação de volume ou velocidade de sua produção com capacidade de alguns isolados de “quebrar” fatores de resistência presentes em plantas hospedeiras (Yao & Allen, 2007; Wairuri *et al.*, 2012).

Existe pouca informação disponível na literatura sobre resistência aos diferentes grupos de antibióticos por espécies do gênero *Ralstonia* bem como o uso dessa informação no desenvolvimento de meios semi-seletivos. As primeiras tentativas de elaboração de meios semi-seletivos para o gênero *Ralstonia* foram feitas no início da década de 1980 (Rica, 1983), quando técnicas moleculares apresentavam custo elevado e não estavam ainda sendo amplamente utilizadas. Entre os meios utilizados para detecção de espécies de *Ralstonia* em amostras vegetais e de solo pode-se citar o SMSA (*Semi selective media of South Africa*), (Singh *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2016). No entanto, atualmente o emprego dos meios semi-seletivos é limitado aos trabalhos de isolamento e detecção. Os meios semi-seletivos atuais são modificações de outros previamente descritos, alterando a concentração e os grupos de antibióticos (Rica, 1983; Elphinstone *et al.*, 1996; Priou *et al.*, 2006; Imazaki & Nakaho, 2010). A maior parte desses meios não apresenta utilidade com isolados brasileiros do gênero *Ralstonia*. Os isolados brasileiros apresentam inibição de crescimento nas concentrações de antibióticos descritas, provavelmente devido à diversidade dos patógenos nos locais onde os referidos meios foram inicialmente desenvolvidos. A ausência de meios semi-seletivos com ampla capacidade de isolamento de espécies de *Ralstonia* representa um interessante campo de pesquisa no sentido



de desenvolver novos e eficientes meios para isolar representantes deste grupo de patógenos nas condições brasileiras.

Os patógenos causadores da murcha bacteriana permanecem no solo por longos períodos, sobrevivendo a partir da utilização de matéria orgânica (van Elsas *et al.*, 2000) e, de forma epifítica, na rizosfera das plantas (Wu *et al.*, 2015). Essa característica biológica do CER torna difícil a sua eliminação de áreas infestadas. Outro fator que dificulta o controle de murcha bacteriana é a ampla gama de espécies hospedeiras (Bi-hao *et al.*, 2009). Diversas alternativas de manejo foram implementadas visando o controle da murcha bacteriana no tomateiro, tais como fertilizantes supressivos (Liu *et al.*, 2015), controle biológico (Hyakumachi *et al.*, 2013; Elsharkawy *et al.*, 2015; Yamamoto *et al.*, 2015), óleos essenciais (Sood & Kumar, 2015), rotação de culturas (Yadessa *et al.*, 2010; Deberdt *et al.*, 2015) e enxertia (Rivard *et al.*, 2012). No entanto, a utilização de cultivares com resistência genética é considerada a estratégia mais eficaz e economicamente viável de controle da murcha bacteriana (Hayward, 1991; Strange & Scott, 2005; Jianwei *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2016).

Devido à importância do CER para a cultura do tomateiro, muita informação já foi obtida sobre cultivares resistentes e sobre os mecanismos de resistência à murcha bacteriana. Fontes de resistência para uso no melhoramento genético já foram descritas, incluindo vários acessos de espécies silvestres do gênero *Solanum* (Kim *et al.*, 2016). No entanto, a linhagem *S. lycopersicum* 'Hawaii 7996' ainda é considerada como uma das melhores fontes de resistência disponíveis, sendo empregada como controle resistente em experimentos de avaliação de resistência a isolados do CER devido a sua estabilidade e ao seu amplo espectro de eficiência (Grimault *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2000; Lebeau *et al.*, 2011). Por essa razão, o acesso 'Hawaii 7996', bem como populações e híbridos derivados desse acesso, se tornaram opções preferenciais para emprego como porta enxerto (Cardoso *et al.*, 2006; Lopes *et al.*, 2015) e também no desenvolvimento de cultivares resistentes (Scott *et al.*, 2004).

A resistência contra uma ampla gama de isolados do CER identificada no acesso ‘Hawaii 7996’ é controlada por diversos QTLs (*Quantitative Trait Loci*) que apresentam distintos efeitos na expressão fenotípica dessa característica (Kim *et al.*, 2016). Os QTLs presentes no cromossomo 6 e no cromossomo 12 têm participação importante na expressão dos níveis e no espectro da resistência (Wang *et al.*, 2000). Por exemplo, no cromossomo 6 residem fatores de resistência de mais amplo espectro, enquanto no cromossomo 12 existem QTLs que englobam fatores de resistência do tipo isolado-específico (Wang *et al.*, 2000). Milling *et al.* (2011) confirmaram a resistência do acesso ‘Hawaii 7996’ a isolados de raça 1/biovar 3 (filotipo I). No entanto, foi verificado que um isolado da raça 3/biovar 2 (filotipo II) foi capaz de “quebrar” a resistência do ‘Hawaii 7996’ (Milling *et al.*, 2011).

O CER é considerado um grupo de patógenos cosmopolita, apresentando uma extensa gama de hospedeiras (Genin & Denny, 2012). Em trabalhos recentes foram identificadas variantes dentro do CER que apresentaram um aumento da gama de plantas hospedeiras. Originalmente causando murcha em bananeiras, isolados da raça 2, filotipo II, têm variantes que passaram a afetar outras hospedeiras como antúrio, cucurbitáceas e solanáceas, incluindo a importante espécie batateira (Wicker *et al.*, 2007). Frequentemente novas hospedeiras são relatadas no mundo para este importante grupo de patógenos. Na última revisão de hospedeiras de bacterioses no Brasil, foram identificadas 77 espécies relatadas como suscetíveis ao CER (Malavolta *et al.*, 2008).

## **1.6. Objetivos**

Nesse contexto, o escopo do presente capítulo foi caracterizar e elucidar os potenciais mecanismos de virulência de um isolado de *R. solanacearum* (denominado de CNPH-RS 488), que se mostrou altamente virulento à linhagem resistente ‘Hawaii 7996’. Para tal, foram conduzidos estudos comparativos com outros isolados com mesma biovar. A resposta de um

conjunto de linhagens de tomateiro, de um clone suscetível de batata e de outras espécies hospedeiras a este isolado foi comparada com outros isolados do CER disponíveis na coleção de bactérias da Embrapa Hortaliças. Investigações sobre potenciais mecanismos de patogênese e também, diferença de antibiograma entre os diversos isolados foram também conduzidos visando uma caracterização fenotípica mais completa desse isolado de *R. solanacearum*.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

De acordo com os objetivos de cada experimento, diferentes combinações de isolados foram usadas. As informações sobre os isolados pertencentes ao CER utilizados nos diferentes bioensaios descritos no presente trabalho estão detalhadas na **Tabela 4.** Todos os experimentos foram realizados no Centro Nacional de Pesquisas de Hortaliças (CNPB) nos laboratórios de Fitopatologia e de Genômica ou na casa de vegetação 01. Os isolados brasileiros do gênero *Ralstonia* da coleção de bactérias da Embrapa Hortaliças que foram utilizados para os experimentos foram mantidos armazenados em tubos de 5 mL com água mineral em temperatura ambiente. Os isolados exóticos (de origem externa ao Brasil) foram cedidos pela University of Wisconsin.

### **2.1. Caracterização do isolado CNPB-RS 488**

#### **2.1.1. Identificação da biovar**

A caracterização da biovar do isolado CNPB-RS 488 foi conduzida de acordo com os critérios estabelecidos por Hayward (1991) com modificações. Uma placa de cultura de tecidos de 24 poços foi utilizada como suporte nas análises da capacidade do isolado de metabolizar açúcares e alcoóis (Buddenhagen & Kelman, 1964; Hayward, 1991; Hayward, 1994). Avaliações foram feitas após 14 dias de incubação em câmara de crescimento a 28°C.

### **2.1.2. Identificação de filotipo**

O filotipo do isolado CNPH-RS 488, foi determinado pelo uso da técnica de PCR Multiplex, que utiliza diferentes *primers* em conjunto em uma única reação. Foram utilizados os *primers* Nmult: 21: 1F, Nmult: 21: 2 F, Nmult: 22: inf, Nmult: 23: AF na direção senso, e somente um *primer* no sentido reverso (antisenso), o Nmult: 22: RR. A identificação/diferenciação de cada filotipo de um isolado foi feita pela análise do perfil de *amplicons* gerados com esse conjunto de *primers* da região 16S RNA ribossomal, de acordo com Fegan & Prior (2005). A reação utilizada foi composta por tampão 1X da *Taq* DNA polimerase, 0,2 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2U de *Taq* polimerase, 0,24 µL dos *primers* Nmult:21: 1F, Nmult:21: 2F, Nmult:22: InF, 0,4 µL do *primer* Nmult22: RR, 0,72 µL do *primer* Nmult: 23: AF. O volume final da reação foi ajustado para 25 µL pela adição de água Milli-Q. A PCR seguiu o seguinte protocolo: desnaturação inicial a 96°C/5 minutos, 30X (94°C/15 s, 59°C /30 s, 72°C/30 s) e extensão final de 72°C/10 min. Todos os fragmentos gerados pela reação multiplex foram analisados em gel de agarose a 1,25% e corados com brometo de etídio.

## **2.2. Testes de patogenicidade**

### **2.2.1. Teste de patogenicidade em tomateiro e batateira**

Para caracterização patogênica do isolado CNPH-RS 488, foi realizado um teste de patogenicidade na linhagem de tomateiro suscetível ('L390') e na linhagem resistente ('Hawaii 7996') (Wang *et al.*, 2000). Esses ensaios foram conduzidos visando confirmar a capacidade do isolado CNPH-RS 488 de suplantar resistência da linhagem 'Hawaii 7996' em comparação com outros isolados da biovar 2A (CNPH-RS 461, CNPH-RS 498 e CNPH-RS 534) (**Tabela 4**). Esses três isolados foram selecionados tendo como critério um período transcorrido de isolamento menor ou igual do que três anos em relação ao isolado CNPH-RS 488 (obtido em 2012). Além disso, os isolados incluídos nas análises foram obtidos de batata ou tomate (hospedeiras dentro da família Solanaceae). Os isolados selecionados para essas avaliações

foram riscados em meio CPG (Kelman, 1954) com modificações, substituindo a sacarose pelo glicerol. As placas foram mantidas em câmara de crescimento por 48 horas a 28°C. Colônias típicas foram repicadas para outras placas e mantidas pelo mesmo período em câmara de crescimento.

Mudas das linhagens de tomateiro ('L390' e 'Hawaii 7996') foram produzidas em casa de vegetação após semeio em bandejas de isopor preenchidas com substrato esterilizado. As mudas com aproximadamente quatro folhas verdadeiras ( $\approx$  25 dias após semeio) foram transplantadas para vasos de 0,5 L. Para a batata, tubérculos brotados da cultivar suscetível 'Monalisa' foram plantados em vasos com substrato. Após o surgimento de brotos acima da superfície do solo, as plantas foram consideradas prontas para a inoculação. A inoculação foi realizada pela penetração do caule, 3 cm acima do nível do solo, utilizando um alfinete de costura N°7 previamente inserido em uma colônia de cada isolado (Hong *et al.*, 2008). O delineamento foi inteiramente casualizado com duas plantas por vaso, com um total de oito plantas de cada linhagem para cada isolado. As plantas inoculadas foram mantidas em casa de vegetação, com sistema de aquecimento noturno, sob uma temperatura entre 20 e 40°C. Essas temperaturas controladas foram aplicadas visando minimizar a frequência de possíveis escapes das plantas à infecção pelos isolados do patógeno. A incidência da doença foi avaliada diariamente assim que a primeira planta apresentou sintomas de murcha. As avaliações foram encerradas aos 15 dias após a primeira avaliação. A reação foi considerada positiva quando mais de 50% das folhas de cada planta apresentavam sintomas de murcha.

### **2.3. Correlação UFC/mL e absorbância e titulação de infectividade**

Visando verificar uma potencial correlação entre o valor de absorbância em espectrofotômetro e as unidades de formação de colônia (UFC/mL), os isolados de *R. solanacearum* previamente selecionados (CNPH-RS 461, CNPH-RS 488, CNPH-RS 498 e

CNPH-RS 534) (**Tabela 4**) foram riscados, repicados e as colônias foram raspadas após adição de água destilada para alcançar 0.2 de absorbância no espectrofotômetro, no comprimento de onda de 550 nm (Yamada *et al.*, 2007). Em seguida foi realizada uma diluição seriada (seis vezes) das suspensões. Alíquotas de 100 µL das três menores concentrações foram riscadas em placas contendo meio Kelman, com três repetições para cada isolado. As placas foram incubadas em câmara de crescimento por 48 horas a 28°C. Cada placa foi subdividida em quatro regiões e as colônias contadas para obter uma estimativa de média e um cálculo aproximado do número de UFC/mL da suspensão original.

**Tabela 4.** Lista de isolados do complexo de espécies de *Ralstonia* usados nos experimentos com suas respectivas hospedeiras, local de coleta, data do isolamento, biovar e filotipo. Isolados com origem no Brasil foram identificados com o Estado/País de origem, isolados estrangeiros foram identificados com o país de origem.

Isolado	Hospedeira	Local	Data	Biovar	Filotipo
CNPH-RS 077	Berinjela	Distrito Federal	1991	2T	II
CNPH-RS 403	Tomate	Acre	2010	3	I
CNPH-RS 429	Batata	Minas Gerais	2010	2A	II
CNPH-RS 443	Tomate	Distrito Federal	2011	1	II
CNPH-RS 460	Tomate	Paraná	2011	1	I
CNPH-RS 461	Batata	Bahia	2011	2A	II
CNPH-RS 482	Eucalipto	Goiás	2012	2T	II
CNPH-RS 488	Tomate	Paraná	2012	2A	II
CNPH-RS 489	Tomate	Paraná	2012	1	II
CNPH-RS 501	Tomate	Ceará	2012	1	II
CNPH-RS 506	Berinjela	Ceará	2012	2A	II
CNPH-RS 507	Berinjela	Ceará	2012	3	I
CNPH-RS 510	Tomate	Bahia	2013	3	I
CNPH-RS 534	Batata	Goiás	2013	2A	II
CNPH-RS 537	Batata	São Paulo	2013	2A	II
CNPH-RS 541	Pimenta	Distrito Federal	2013	3	I
CNPH-RS 546	Batata	Minas Gerais	2014	2T	II
GMI1000	Tomate	Guiana Francesa	1978	1	I
K60	Tomate	EUA, NC	1954	1	II
UW151	Gengibre	Austrália	1967	4	I
UW363	Tomate	China	1980	3	I
UW386	Tomate	Nigéria	1983	1	III

Para o ensaio de titulação de infectividade (padronização da pressão de inóculo) foram empregadas plantas de tomateiro das linhagens ‘Hawaii 7996’ e ‘L390’, multiplicadas em bandejas de isopor de 128 células com substrato esterilizado, até o estágio de quatro folhas verdadeiras. Os isolados para a inoculação foram selecionados baseando-se nos experimentos anteriores, sendo eles: CNPH-RS 461, CNPH-RS 488, CNPH-RS 498 e CNPH-RS 534 (**Tabela 4**). Os isolados foram cultivados em meio CPG sem tetrazólio e mantidos em câmara de crescimento por 48 horas a 28°C. Colônias típicas foram selecionadas, repicadas para outras placas e mantidas pelo mesmo tempo em câmara de crescimento. O inóculo foi obtido pela raspagem das colônias do meio com concentração de  $10^8$  UFC/mL, ajustada em espectrofotômetro. Diluições seriadas foram obtidas e ajustadas para as concentrações de  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  UFC/mL. Para a inoculação, 18 plantas de cada linhagem tiveram seu sistema radicular (ainda aderido ao substrato da bandeja) pulverizado com um borrifador, distribuindo 1 mL por cada uma das quatro faces do torrão, atingindo o volume de 4 mL por planta (Lopes *et al.*, 2015). Após a inoculação, as plantas foram transplantadas para vasos de 1 L e mantidas em casa de vegetação com aquecimento noturno e temperatura ambiente entre 20 e 40°C. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com uma planta por vaso e 18 por linhagem por isolado. As avaliações se iniciaram três dias após a inoculação, prolongando-se por 16 dias após a inoculação.

#### **2.4. Quantificação de Exopolissacarídeo (EPS).**

Para a quantificação da produção de EPS dos isolados biovar 2A, CNPH-RS 429, CNPH-RS 461, CNPH-RS 498, CNPH-RS 506, CNPH-RS 534, e do isolado CNPH-RS 488 (**Tabela 4**) foi seguido o protocolo de Brumbley & Denny (1990). Foram incluídos os isolados de referência K60 (biovar 1), GMI1000 (biovar 3), CNPH-RS 541 (biovar 3) e também isolados de outras biovars (1, 2A e 2T). Os isolados foram riscados em meio CPG e incubados em câmara de crescimento por 48 horas a 28°C. Colônias típicas foram repicadas para tubos

Falcon® de 50 mL esterilizados, contendo 10 mL de meio BG (1% peptona bacteriológica, 0.1% caseína hidrolisada, 0,1% extrato de levedura, 0,5% glicerol) e postas para crescer em mesa agitadora orbital por 48 horas a 28°C e 210 rpm. As suspensões foram centrifugadas a 10.000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante removido para outro tubo onde foram adicionados quatro volumes de acetona para precipitação (*overnight* a 4°C). Após a precipitação, os tubos foram centrifugados a 13.000 X g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi removido. Foram adicionados 500 µL de água Milli-Q e os tubos colocados em banho-maria a 65°C por 10 minutos, para solubilização completa do *pellet*. Somente 10 µL da solução foram utilizados no teste.

Para a quantificação do EPS, foi feita uma curva de calibração com sacarose. Para isso, uma solução na concentração de 10 mg/mL foi feita e por meio de diluição seriada, foram produzidas soluções de 0,5 mL com 10, 20, 40, 60, 80, 100 e 200 µg.mg<sup>-1</sup> cada. Após o preparo dos padrões, foi adotado o procedimento de Dubois *et al.* (1956), adicionando 500 µL de solução de fenol 5% (agitado levemente). Em seguida foram adicionados 2,5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, diretamente sobre a amostra e brevemente homogeneizando. As amostras permaneceram por 20 minutos em temperatura ambiente para resfriamento. As leituras foram realizadas em cubetas de vidro em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 485 nm (Murthy & Srinivas, 2015). Para a quantificação do EPS produzido pelos isolados, a mesma metodologia descrita para a curva de calibração foi aplicada. Para o experimento, os nove isolados utilizados foram analisados com três repetições por isolado. Os gráficos foram gerados e os resultados analisados pelo teste de Scott-Knott ao nível de significância de 5% no programa SISVAR (Ferreira, 2011).



## 2.5. Produção de biofilme

Devido ao papel relevante do biofilme na patogênese de bactérias do CER, estudos foram conduzidos visando determinar correlação entre uma eventual produção diferenciada de biofilme do isolado CNPH-RS 488 em comparação com outros isolados não virulentos na linhagem 'Hawaii 7996' tais como subgrupos pertencentes à biovar 1 (CNPH-RS 443, CNPH-RS 460, CNPH-RS501); à biovar 2A (CNPH-RS 429, CNPH-RS 461, CNPH-RS 498, CNPH-RS 506, CNPH-RS 534, CNPH-RS 537); à biovar 2T (CNPH-RS 77, CNPH-RS 482, CNPH-RS 546); à biovar 3 (CNPH-RS 403, CNPH-RS 507, CNPH-RS 510, CNPH-RS 541) e os isolados padrões de referência, K60, GMI1000, UW151, UW363 e UW386 (**Tabela 4**).

Para o ensaio, os isolados foram riscados e repicados como descrito anteriormente no tópico 2.2.1. Em uma placa de ELISA de 96 poços foram adicionados, em cada poço, 190 µL de meio CPG e em seguida, 10 µL de uma suspensão bacteriana de cada isolado, com absorbância checada previamente em espectrofotômetro em 0,1 (OD<sub>550nm</sub>). O experimento foi conduzido com triplicatas (repetições) para cada um dos 22 isolados das diferentes biovars. A placa foi então incubada em câmara de crescimento por 72 horas a 28°C. Seguiu-se o protocolo de O'Toole & Kolter (1998) com modificações. Após o período de crescimento, foi removido o meio de cultura com bactérias de cada poço, seguindo-se de três lavagens com 200 µL de água Milli-Q cada e incubação por 2 horas a 60°C para secar os poços. Em seguida foram adicionados 150 µL solução com cristal violeta a 0,3%, com incubação por 45 minutos em temperatura ambiente. O corante foi então removido e repetiu-se a lavagem com água Milli-Q. A solubilização foi feita com 150 µL de etanol-acetona (20% de acetona) e, a medição, efetuada em leitor de ELISA com 485 nm de comprimento de onda. Os gráficos foram gerados e analisados pelo teste de Scott-Knott 5%.

## **2.6. Sensibilidade *in vitro* a antibióticos**

Dezesseis antibióticos foram selecionados para a avaliação da sensibilidade *in vitro* de 47 isolados de *R. solanacearum* e do isolado CNPH-RS 488. Os antibióticos utilizados, com suas respectivas concentrações em microgramas por litro foram: ácido pipemídico (20); ampicilina (10); cefalotina (30); cefazolina (30); cefoxitina (30); ciprofloxacina (5); clindamicina (2); cloranfenicol (30); cotrimoxazol (25); eritromicina (15); norfloxacina (10); nitrofurantoina (300); oxacilina (1); penicilina G. (10); tetraciclina (30) e tobramicina (10).

Suspensões de cada isolado foram quantificadas em espectrofotômetro e ajustadas para a concentração de  $10^8$  UFC/mL. Meio Kelman foi vertido em placas de petri de 10 cm de diâmetro, em seguida, 10 mL de meio semi-sólido (0,5% ágar) foi misturado com 5 mL da suspensão bacteriana e vertido sobre uma camada de meio Kelman. Os discos de antibióticos foram acondicionados e pressionados contra o meio semi-sólido e então, as placas foram postas em câmara de crescimento por 72 horas à 28°C. Para as avaliações, o halo foi mensurado quanto ao seu diâmetro, considerando também o tamanho do disco de antibiótico.

O meio semi-seletivo SMART (Kawanishi *et al.*, 2011) foi avaliado para os mesmos isolados. Este meio de cultura tem na sua composição os antibióticos polimixina B, ciclohexamida e cloranfenicol. Colônias puras de cada isolado foram riscadas em placas de meio sólido SMART subdivididas e permaneceram em câmara de crescimento por cinco dias (120 horas) com temperatura de 28°C. Foram classificados como positivos aqueles isolados com crescimento visível de colônias de *R. solanacearum*.

## **2.7. Resposta de uma gama de plantas hospedeiras a inoculações com o isolado CNPH-RS 488**

Plantas de tomateiro (*S. lycopersicum*), berinjela (*S. melongena*), jiló (*S. aethiopicum* var. *gilo*), amendoim (*Arachis hypogaea*), gergelim (*Sesamum indicum*) e tagetes (*Tagetes erecta*)

foram selecionadas para estudo da resposta à infecção por se tratarem de espécies já relatadas como suscetíveis ao CER, porém com níveis distintos de resistência. Para esse ensaio, cinco isolados foram selecionados: GMI1000 (raça 1/biovar 3), UW363 (raça 1/biovar 3), CNPH-RS 449 (raça 1/biovar 3), CNPH-RS 488 (raça 1/biovar 2A) e CNPH-RS 489 (raça 1/biovar 1) (**Tabela 4**). O preparo dos isolados e do inóculo seguiram os mesmos procedimentos descritos no tópico 2.2.1. Quatro plantas para cada espécie por isolado foram inoculadas e mantidas em casa de vegetação com temperatura entre 20 e 40°C com aquecimento noturno, visando minimizar possíveis escapes. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com quatro plantas por vaso. A avaliação da incidência de murcha nas plantas foi realizada aos 20 dias após a inoculação. Teste do copo (de fluxo bacteriano) foi feito visando confirmação da ausência de muco bacteriano em plantas assintomáticas.

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1. Caracterização da biovar e filotipo do isolado CNPH RS-488**

Para a análise da biovar, foi observada oxidação dos meios com celobiose, lactose, maltose e não oxidação dos alcoóis dulcitol, manitol e sorbitol, indicando que o isolado pertence à biovar 2. A ausência de oxidação dos meios contendo inositol e trealose indicou que o isolado pertence à biovar 2A.

No resultado da PCR multiplex para identificação dos filotipos, como descrito por Fegan & Prior (2005), para o filotipo I é gerado um fragmento de 144 pb, para o filotipo II de 372 pb, para o filotipo III um amplicon de 91 pb e para o filotipo IV um amplicon de 213 pb. O isolado CNPH-RS 488 foi caracterizado como filotipo II (**Figura 2**), resultado esperado após a identificação da biovar 2 que compõe o filotipo II.



**Figura 2.** Gel de agarose (1%) resultante da eletroforese dos produtos da PCR multiplex com os *primers* Nmult e o par 759/760 para identificação do filotipo e da espécie dos isolados CNPH-RS 461, CNPH-RS 488 e CNPH-RS 498. Eletroforese com o marcador 1kb *plus*, *amplicon* de 372 pb indica o filotipo II. A presença do *amplicon* de 281 pb confirma que o isolado é do complexo de espécies de *Ralstonia*.

### 3.2. Teste de patogenicidade em tomateiro e batateira

Todos os isolados foram capazes de causar murcha em 100% das plantas da linhagem suscetível ‘L390’, confirmando suas virulências. Foi verificado nestes bioensaios que o isolado CNPH-RS 488 (raça 3/biovar 2A) é altamente virulento à linhagem ‘Hawaii 7996’. Todos os isolados, com exceção do CNPH-RS 498, foram capazes de causar murcha em níveis superiores a 50% das plantas da linhagem ‘Hawaii 7996 (Tabela 5)’. No entanto, somente o isolado em destaque, CNPH-RS 488, causou murcha em 100% das plantas testadas. Na batateira suscetível ‘Monalisa’, somente o isolado CNPH-RS 534 não causou 100% de murcha.

**Tabela 5.** Percentagem de plantas apresentando sintomas de murcha em testes de patogenicidade conduzidos com quatro isolados de *Ralstonia solanacearum* (raça 3/biovar 2). Plantas de duas linhagens de tomateiro, ‘L390’ (suscetível) e ‘Hawaii 7996’ (resistente) e da batateira suscetível ‘Monalisa’ foram inoculadas pelo método de penetração do caule.

Isolados	Tomateiro		Batateira
	Suscetível	Resistente	Suscetível
	L390	H7996	Monalisa
<b>CNPH-RS 461</b>	100	62.5	100
<b>CNPH-RS 488</b>	100	100	100
<b>CNPH-RS 498</b>	100	0	100
<b>CNPH-RS 534</b>	100	50	25

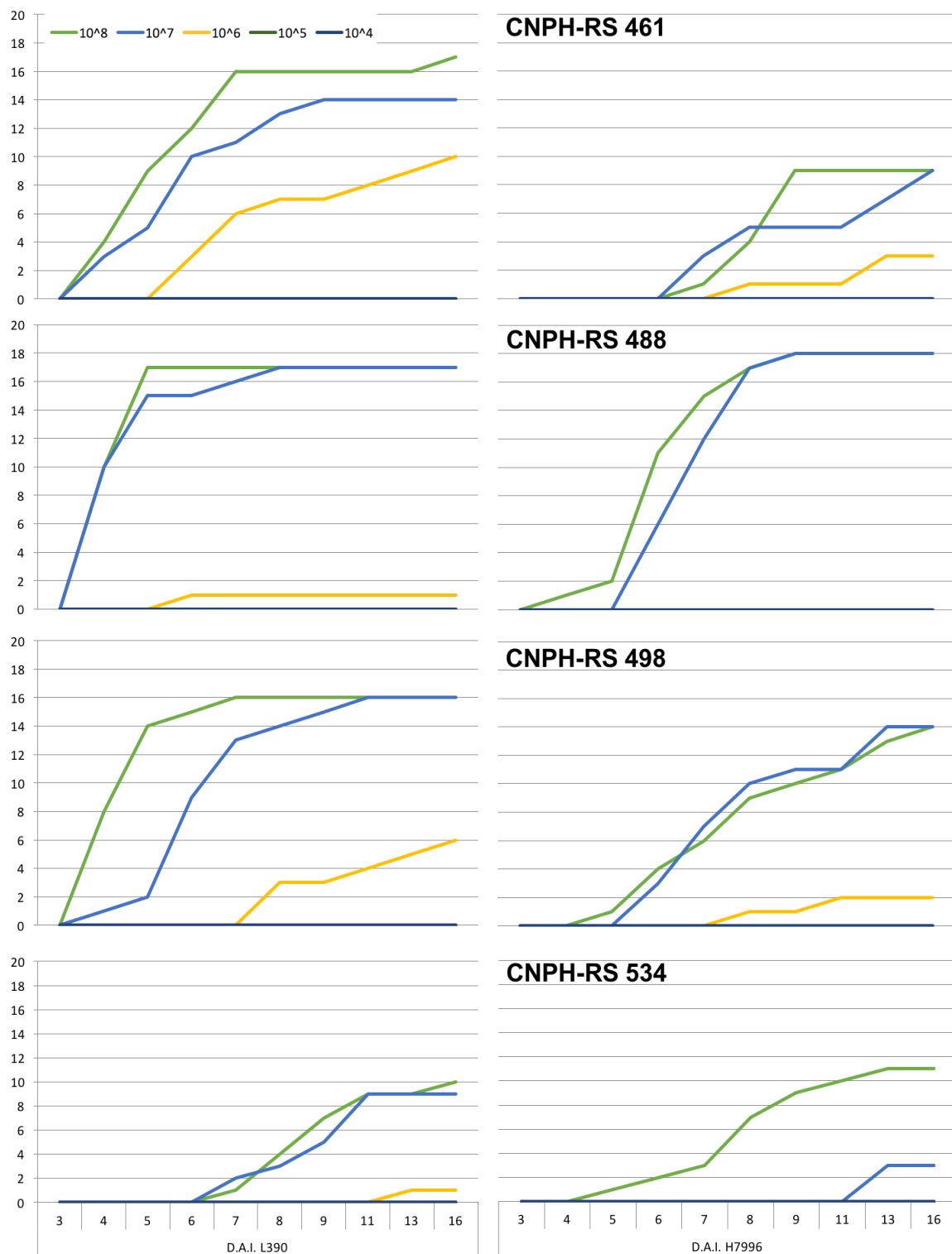
### 3.3. Titulação de infectividade

Todos os isolados foram capazes de causar sintomas de murcha na linhagem suscetível de tomateiro e no clone suscetível de batata (**Figura 3; Tabela 5**), porém com diferenças nos níveis de virulência.

Nas menores concentrações, de  $10^4$  UFC/mL e  $10^5$  UFC/mL, nenhum dos isolados conseguiu induzir sintomas de murcha em nenhuma das duas linhagens contrastantes de tomateiro. Na concentração de  $10^6$  UFC/mL, um número reduzido de plantas apresentou sintomas de murcha. O isolado CNPH-RS 461 murchou 55,55% das plantas da linhagem ‘L390’ contra 22,22% de ‘Hawaii 7996’. O isolado CNPH-RS 488 murchou 5,55% de ‘L390’ contra zero em ‘Hawaii 7996’. O isolado CNPH-RS 498 murchou 33,33% de ‘L390’ e 11,11% de ‘Hawaii 7996’. O isolado CNPH-RS 534 murchou 5,55% de ‘L390’ e zero em ‘Hawaii 7996’. Já na concentração de  $10^7$  UFC/mL houve um maior número de plantas murchas, para o isolado CNPH-RS 461, 77,77% das plantas de ‘L390’ murcharam e 50% em ‘Hawaii 7996’. Para o isolado CNPH-RS 488, 94,44% de plantas de ‘L390’ murcharam contra 77,77% de ‘Hawaii 7996’. O isolado CNPH-RS 534 murchou 50% de plantas de ‘L390’ e 22,22% de ‘Hawaii 7996’. Na maior concentração, de  $10^8$  UFC/mL, o isolado CNPH-RS 461 murchou 94,44% das

plantas de 'L390' e 50% de 'Hawaii 7996'. O isolado CNPH-RS 488, com somente cinco dias após a inoculação (D.A.I.), murchou 94,44% das plantas de 'L390' e em 9 D.A.I. 100% de 'Hawaii 7996'. O isolado CNH-RS 498, com sete D.A.I., murchou 88,88% de 'L390' e 77,77% de 'Hawaii 7996'. Para o último isolado, CNPH-RS 534, 55,55% das plantas de 'L390' murcharam e 61,11% de 'Hawaii 7996'. A evolução das plantas murchas pelo isolado CNPH-RS 488 foi mais rápida do que nos demais isolados, ao contrário do isolado CNPH-RS 534 que evoluiu lentamente, murchando um reduzido número de plantas de ambas as linhagens inoculadas (**Figura 3**).

Para a análise dos resultados da titulação de infectividade, foi estabelecido o limiar baseado no número de D.A.I. para um isolado causar 50% de murcha nas plantas de cada uma das linhagens. Na concentração mais elevada, para a linhagem 'Hawaii 7996', o CNPH-RS 488 conseguiu suplantar o próximo isolado, CNPH-RS 498, em 2 D.A.I. e em 3 D.A.I. para os demais isolados. Para 'L390', o CNPH-RS 488 superou o isolado com similar virulência, CNPH-RS 498, em 1 D.A.I. em 2 D.A.I. para o isolado CNPH-RS 461 e 7 D.A.I. para o CNPH-RS 534. Em comparação entre as linhagens, a 'Hawaii 7996' somente alcançou o limiar de 2 D.A.I. depois da linhagem 'L390', para o isolado CNPH-RS 488, 3 D.A.I. para o CNPH-RS 498, 4 D.A.I. para o CNPH-RS 461 e menos 2 D.A.I. para o CNPH-RS 534.



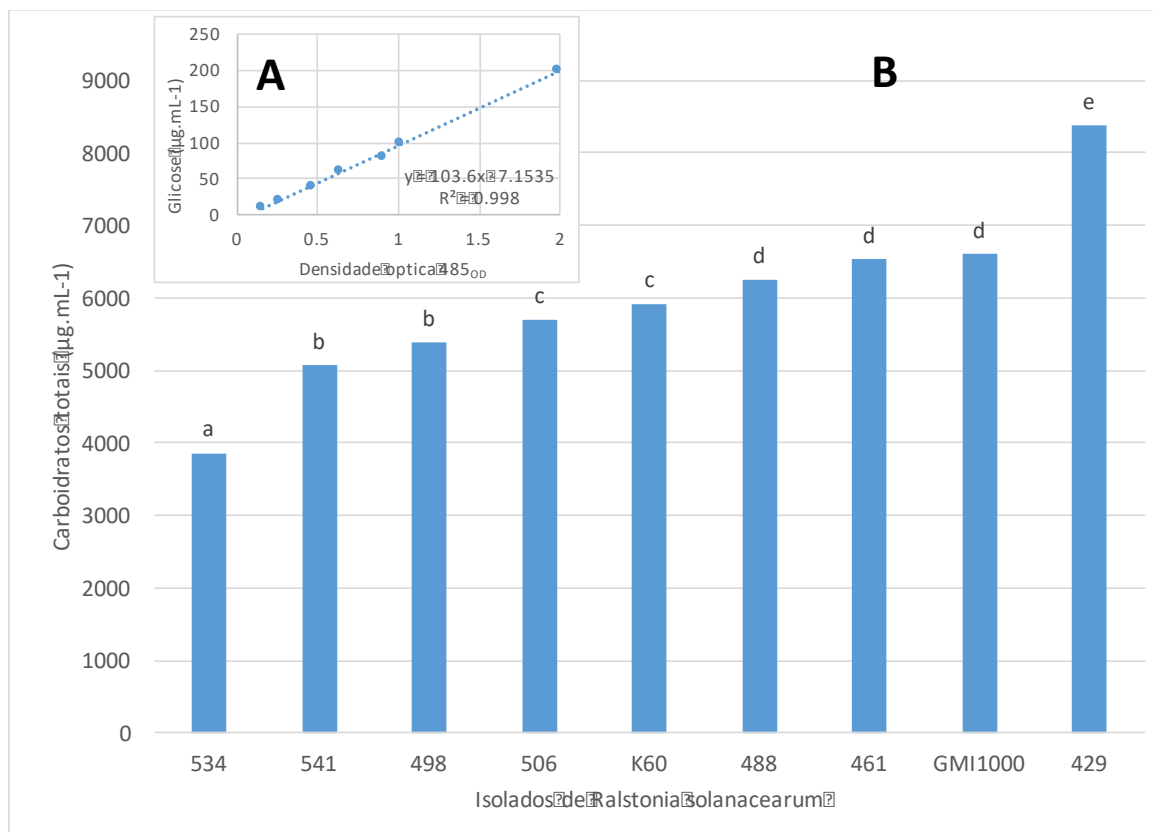
**Figura 3.** Titulação de infectividade das linhagens de tomateiro ‘L390’ (suscetível) e ‘Hawaii 7996’ (resistente) avaliadas com cinco concentrações de inóculo de quatro isolados de *Ralstonia solanacearum* (CNPH-RS 461, CNPH-RS 488, CNPH-RS 498, CNPH-RS 534). As plantas foram avaliadas dos três até os 16 dias após a inoculação. As cores representam os resultados obtidos com as diferentes concentrações de inóculo. Eixo vertical representa o

número absoluto de plantas murchas enquanto o horizontal o número de dias após a inoculação (D.A.I.). O método de Inoculação utilizado foi de borrifamento das raízes com aproximadamente 4 mL de suspensão bacteriana.

### **3.4. Produção de EPS**

A quantidade de EPS produzida pelos diferentes isolados em análise apresentou diferenças significativas (Scott-Knott 5%). CNPH-RS 429 foi o isolado que apresentou maior produção de EPS, seguido dos isolados CNPH-RS 488, CNPH-RS 461 e GMI1000 (**Figura 4**). Outro grupo foi formado pelos isolados CNPH-RS 506 e K60. Os isolados CNPH-RS 541, CNPH-RS 498 e CNPH-RS 534 foram os que apresentaram a menor produção de EPS. Os dados de produção foram analisados usando uma curva padrão com  $R^2$  de 0,998, indicando bom ajuste aos dados, e a equação  $y = 103,6x - 7,1535$ .





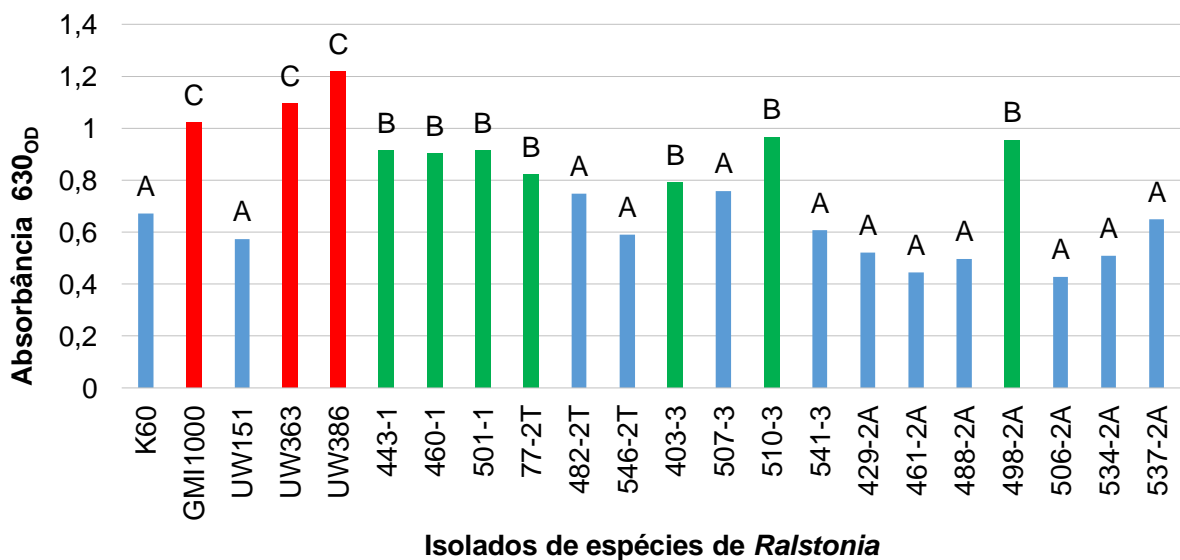
**Figura 4.** Variação na produção de exopolissacarídeo (EPS) por diferentes isolados do complexo de espécies de *Ralstonia*. A – Curva de calibração para estimativa da concentração de carboidratos totais. B – Médias das estimadas das concentrações de carboidratos totais nos diferentes isolados do complexo de espécies de *Ralstonia*. Médias seguidas por diferentes letras em cada coluna diferiram estatisticamente, entre si, para o teste de Scott-Knott (5% de probabilidade).

### 3.5. Produção de biofilme

Após 72 horas, foi possível observar diferenças significativas de produção de biofilme. Pela análise de Scott-Knott ao nível de significância de 5%, os isolados foram divididos em três grupos (**Figura 5**). O primeiro grupo foi composto por isolados que produziram as menores quantidades de biofilme (K60, UW551, CNPH-RS 429, CNPH-RS 461, CNPH-RS 482, CNPH-RS 488, CNPH-RS 507, CNPH-RS 506, CNPH-RS 534, CNPH-RS 537, CNPH-RS 541 e CNPH-RS 546). O segundo grupo foi composto por isolados com produção intermediária de

biofilme (CNPH-RS 77, CNPH-RS 403, CNPH-RS 443, CNPH-RS 460, CNPH-RS 498, CNPH-RS 501 e CNPH-RS 510). O terceiro grupo foi formado por isolados de elevada produção de biofilme (GMI1000, UW363 e UW386).

Os isolados da biovar 1 apresentaram produção intermediária de biofilme; enquanto que os isolados da biovar 2A, incluindo o isolado CNPH-RS 488, se posicionaram no grupo com baixa produção. A única exceção dentro do grupo de isolados da biovar 2A foi CNPH-RS 498. Os isolados da biovar 2T apresentaram variações, sendo que dois dos três isolados agruparam com os que menos produziram, com exceção do isolado CNPH-RS 77 com produção intermediária. Dois dos quatro isolados biovar 3 foram identificados com capacidade de produção de biofilme intermediária, e o isolado CNPH-RS 507 com produção menor. Os isolados de referência oscilaram dentro dos grupos, tendendo ao grupo com a mais alta produção de biofilme.



**Figura 5.** Quantificação da produção de biofilme por isolados do complexo de espécies de *Ralstonia* de diferentes filotipos e biovars com análise estatística por teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

### 3.6. Sensibilidade *in vitro* a antibióticos

No teste do meio semi-seletivo SMART, ocorreu o crescimento dos isolados de biovar 3 no meio, não ocorrendo o mesmo com isolados de biovars 1, 2A e 2T (**Tabela 6**). Para os 16 antibióticos usados no antibiograma, somente clindamicina e oxacilina não inibiram nenhum dos isolados. A nitrofurantoina inibiu cinco isolados, CNPH-RS 12, CNPH-RS 66, CNPH-RS 71, CNPH-RS 77, CNPH-RS 94, CNPH-RS 437. A penicilina inibiu 25 isolados (CNPH-RS 12, CNPH-RS 44, CNPH-RS 59, CNPH-RS 66, CNPH-RS 67, CNPH-RS 94, CNPH-RS 313, CNPH-RS 403, CNPH-RS 429, CNPH-RS 433, CNPH-RS 437, CNPH-RS 449, CNPH-RS 461, CNPH-RS 481, CNPH-RS 482, CNPH-RS 488, CNPH-RS 498, CNPH-RS 501, CNPH-RS 508, CNPH-RS 510, CNPH-RS 534, CNPH-RS 541 e CNPH-RS 546). Os isolados da biovar 2A apresentaram um padrão diferenciado, sendo menos suscetíveis à cefalotina, com seis dos oito isolados classificados como resistentes, já para os antibióticos ampicilina e cefazolina, cinco dos oito não foram inibidos. O isolado CNPH-RS 488 (que também é de biovar 2A) foi sensível à cefazolina e não aos outros dois antibióticos destacados.

**Tabela 6.** Resposta de sensibilidade *in vitro* de 48 isolados de quatro biovars (1, 2A, 2T e 3) do complexo de espécies de *Ralstonia* a 16 antibióticos e ao meio semi-seletivo SMART de (Kawanishi *et al.*, 2011). (+) = crescimento; (-) = inibição de crescimento. Os números na tabela representam o diâmetro do halo de inibição em centímetros.

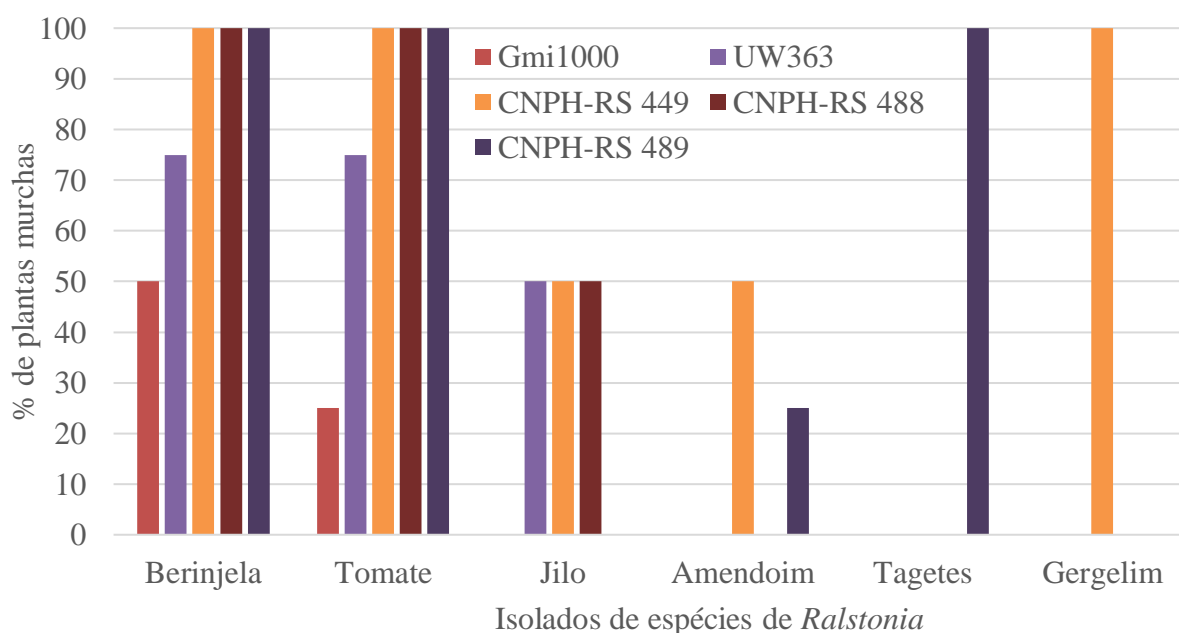
Biovar	Isolado	SMART	Á.C. Pipemídico	Ampicilina	Cefalotina	Cefazolina	Cefoxitina	Ciprofloxacina	Clindamicina	Cloranfenicol	Cotrimoxazol	Eritromicina	Norfloxacina	Nitrofurantoina	Oxacilina	Penicilina	Tetraciclina	Tobramicina
1	433	-	1,3	1,3	0,7	0,7	1,4	3,1	0	1,6	1,3	2	2,7	0	0	0	2,7	1,7
1	436	-	1,6	2	1,5	1,5	1,6	3,1	0	1,6	1,9	2,4	2,7	0	0	1,1	3	1,8
1	460	-	1,5	2,4	1,7	1,9	2	3,8	0	1,9	2,3	2,1	3,2	0	0	1,2	3,2	1,7
1	501	-	2,3	1,9	1,3	1,7	1,8	3,6	0	1,6	1,9	1,9	3,2	0	0	0	3,1	1,7
1	518	-	1,9	2,1	1,4	1,5	1,7	4,3	0	1,6	2,6	2,5	2,9	0	0	1,1	3,6	1,9
1	522	-	1,9	1,9	1,4	1,5	1,7	3	0	1,6	1,7	2,1	2,4	0	0	1	2,9	1,9
1	533	-	1,8	1,5	1,1	1,3	0	3	0	1,7	1,9	1,9	2,3	0	0	1	3	2

1	<b>536</b>	-	1,9	2	1,1	1,6	1,9	3,7	0	1,6	2,5	2,8	3,1	0	0	1,5	3,3	2,3
1	<b>545</b>	-	1,8	1,8	1,1	1,6	1,7	3,3	0	1,9	1,6	2,2	2,5	0	0	1,1	3,2	2
2A	<b>12</b>	-	0	2,5	2,1	2	2	2,3	0	1,5	2,3	2	1,9	1	0	0	4,5	1,1
2A	<b>429</b>	-	1,4	0	0	0	2,3	2,7	0	1,3	2	1,5	2,7	0	0	0	3,2	1,4
2A	<b>437</b>	-	1,6	1	0	0	1,8	2,5	0	1,6	2,8	1,4	2,5	1	0	0	3,5	1,4
2A	<b>461</b>	-	1	0	0	0	1,7	3	0	1,9	2,5	1,3	2,5	0	0	0	3	1,3
2A	<b>488</b>	-	1,5	0	0	1	1,9	3	0	1,4	1,8	1,5	3	0	0	0	3	1,3
2A	<b>498</b>	-	1,5	0	0	0	0	2,6	0	1,9	2	2	2,8	0	0	0	2,8	1,5
2A	<b>534</b>	-	1,3	0	0	0,1	1,3	2,5	0	2	2,2	1,8	2,5	0	0	0	3,2	1,3
2A	<b>541</b>	-	1,3	0,8	0,9	0	0	2,5	0	2,4	1,5	2	2,3	0	0	0	3,2	1,6
2T	<b>44</b>	-	0,8	2,3	1,2	1,2	1,7	2,7	0	1,9	2,3	1,6	2,3	0	0	0	2,8	1,5
2T	<b>59</b>	-	1,2	2	0	0	1	2	0	1,9	1,7	2	2,1	0	0	0	2,8	1,4
2T	<b>66</b>	-	2,6	1,6	0	1	0	4,5	0	1,2	1,8	0	4	1	0	0	2,8	2
2T	<b>67</b>	-	1,4	1,8	0	1,2	0	3,4	0	2	1,7	1,8	2,3	0	0	0	2,8	1,3
2T	<b>71</b>	-	1,5	2,3	1	1,1	1,4	3,2	0	1,8	1,8	1,8	2,3	1,4	0	0,8	2,9	1,2
2T	<b>77</b>	-	1	2,4	1,4	1,4	1,9	2,7	0	2,1	2	2,4	2,2	1,5	0	1	2,8	1,6
2T	<b>94</b>	-	1,2	1,5	1,2	1,3	1	2,7	0	1,5	1,6	1,9	2,1	1,1	0	0	2,4	1,5
2T	<b>478</b>	-	1,2	1,7	1,2	1,2	1	2,6	0	1,4	2	1,9	2,5	0	0	1,2	2,5	1,4
2T	<b>481</b>	-	0,9	1,7	0	0	0	2,6	0	1,5	2,3	1,2	2	0	0	0	2,6	1,6
2T	<b>482</b>	-	1	1,7	0	0	0	2,7	0	1,7	2,2	1,6	2	0	0	0	2,6	1,5
2T	<b>546</b>	-	3,3	1,7	1,1	1,2	0,8	4	0	1,5	2,1	0	3,6	0	0	0	2,5	1,6
3	<b>15</b>	+	1,6	2,4	1,8	1,7	1,8	3,3	0	2,3	3,3	2,6	2,7	0	0	1,8	3,6	2
3	<b>18</b>	+	2,4	2,1	1,4	1,3	1,5	2,3	0	2,4	1,6	2,3	1,8	0	0	0,7	3	2,2
3	<b>198</b>	+	1,4	2	1,4	1,4	1,4	2,7	0	2,1	2,3	2,4	2	0	0	0,9	3,4	1,9
3	<b>313</b>	+	1,7	1,9	1,3	1,4	0	2,8	0	2,5	2	2,3	2,4	0	0	0	3,3	1,9
3	<b>318</b>	+	2	2,3	1,1	1,7	1,7	3	0	2,5	2,5	2,8	2,8	0	0	1,2	3,5	2,2
3	<b>321</b>	+	1,4	1,9	1,4	1,6	1,5	2,5	0	2,3	2,3	2,3	2,2	0	0	1,1	2,9	2,3
3	<b>322</b>	+	1,5	2	1,2	1,7	0	2,7	0	2,4	1,8	2,4	2,2	0	0	1	3,4	2,4
3	<b>355</b>	+	1,8	2	1,1	1,3	0	2,3	0	2,3	2,8	2,7	0	0	0	1,1	3,4	1,9
3	<b>403</b>	+	1	1,8	1,3	1,4	0	2,6	0	1,7	1,6	2,8	2,1	0	0	0	3,3	2,1
3	<b>449</b>	+	1,4	1,8	1,1	1,2	0	2,1	0	2,1	1,5	2,2	1,9	0	0	0	3,3	2,3
3	<b>473</b>	+	1,4	2	0,9	1,4	2,1	3	0	1,8	2,3	2,2	2,8	0	0	1,1	3,4	2
3	<b>474</b>	-	1,3	2,1	1,1	1,3	1,8	3	0	1,5	2	2,5	3	0	0	1,2	3,4	2
3	<b>475</b>	+	0,8	2	1,1	1,2	1,8	2,7	0	1,8	2,2	2,5	2,5	0	0	1,3	3,4	1,9
3	<b>476</b>	+	0,8	1,9	1,6	1,6	1,2	3	0	2,8	1,7	2,2	2,5	0	0	1,1	3,4	2,1
3	<b>507</b>	-	1,1	1,9	1,4	1,2	0	2,8	0	2,4	1,8	2,3	2,4	0	0	0,8	3,3	2,1
3	<b>508</b>	+	1,3	1,5	0	1	0	3	0	1,9	1,5	2	2,3	0	0	0	3,1	1,9
3	<b>510</b>	+	1	1,8	1,5	1,5	1,7	3,1	0	2,5	2,2	2,8	2,4	0	0	0	3,4	2,3
3	<b>541</b>	+	1,1	1,8	1	0,9	0	2,6	0	1,8	1,6	2,5	2,1	0	0	0	3,2	1
3	<b>551</b>	+	1,8	2,1	1,4	1,5	1,8	2,5	0	2,9	2,1	2,4	2	0	0	1,4	3,4	2,4
3	<b>556</b>	+	2	1,8	1	1,4	0	3	0	2,7	2,3	2,6	2,5	0	0	0,5	3,3	2

### 3.7. Perfil de virulência em uma gama de plantas hospedeiras

Todos os isolados demonstraram ser virulentos, induzindo murcha em pelo menos três das seis hospedeiras inoculadas (**Figura 6**). O isolado CNPH-RS 488 causou murcha em 100% das plantas de berinjela e tomate e 50% das plantas de jiló. No entanto, esse isolado não induziu sintomas em plantas de amendoim, gergelim e tagetes.

Os isolados GMI1000 e UW363 (biovar 3) não induziram murcha em amendoim, gergelim e tagetes. O isolado GMI1000 também não induziu murcha em plantas de jiló. O isolado CNPH-RS 449 (biovar 1) causou sintomas de murcha em berinjela, amendoim, jiló e gergelim, sem causar doença em tagetes.



**Figura 6.** Porcentagem (incidência) de plantas murchas aos 20 dias após a inoculação de seis hospedeiras (berinjela, tomate, jiló, amendoim, tagetes e gergelim) inoculadas com cinco isolados do complexo de espécies de *Ralstonia*.

#### 4. DISCUSSÃO

Conforme esperado, com base em relatos de vários autores, foram observadas diferenças nos níveis de virulência entre os isolados do CER e nos níveis de resistência das linhagens ‘Hawaii 7996’ e ‘L390’. Os isolados de *R. solanacearum* e *R. pseudosolanacearum* avaliados no presente trabalho apresentaram elevados níveis de virulência, sendo capazes de induzir frequências elevadas de plantas com sintomas de murcha nos acessos suscetíveis de tomateiro e batata. Uma resposta mais ampla e variada foi observada no perfil de virulência de alguns isolados que foram capazes de infectar a linhagem de tomateiro resistente (‘Hawaii 7996’). No caso do germoplasma do tomateiro, o acesso ‘Hawaii 7996’ é considerado a fonte de resistência com maior estabilidade e amplitude (Scott *et al.*, 2004).

Os dados apresentados no presente trabalho estão de acordo com os observados por Carneille *et al.* (2006a) e Lebeau *et al.* (2011), em que genótipos de tomateiro apresentam suscetibilidade similar à batata aos isolados de raça 3/biovar 2A, também apresentando elevado número de plantas murchas. Esse é um dado de interesse, uma vez que o foco do melhoramento genético do tomateiro tem sido identificar e incorporar resistência para isolados da raça 1/biovar 1, que são mais frequentemente observados infectando essa cultura.

Outra observação feita por Carneille *et al.* (2006a) foi que a linhagem ‘Hawaii 7996’ representa uma das poucas resistências descritas para raça 3/biovar 2, porém já existindo casos reportados de suplantação dessa resistência (Milling *et al.*, 2011; Genin & Denny, 2012). Essa capacidade de “quebrar” a resistência da linhagem ‘Hawaii 7996’ foi também encontrada no isolado CNPH-RS 488. Por essa razão, procurou-se identificar quais mecanismos/características poderiam explicar tal perfil de virulência. Para isso, foram conduzidos estudos mais detalhados sobre a titulação de infectividade, produção de EPS e produção de biofilme.

As diferenças no tempo necessário para cada isolado causar 50% de plantas murchas em cada linhagem, demonstrou as diferenças entre os isolados, em especial do isolado capaz de suplantar a resistência do 'Hawaii 7996', CNPH-RS 488.

No presente estudo, as concentrações de  $10^8$  e  $10^7$  UFC/mL não apresentaram marcantes diferenças na capacidade de induzir doença, porém foi possível identificar as diferenças entre os isolados para a quebra de resistência da linhagem 'Hawaii 7996' e também na diferença de virulência. As concentrações utilizadas na titulação de infectividade demonstram que essas influenciam, de maneira consistente, as respostas dos diferentes genótipos resistentes e suscetíveis. De acordo com os dados obtidos por Carmeille *et al.* (2006b), a concentração de  $10^7$  UFC/mL foi suficiente para induzir doença e minimizar escapes. O sistema *quorum sensing*, responsável pelo controle tanto da patogênese quanto do metabolismo bacteriano (Schell, 2000; Genin *et al.*, 2005), é uma das hipóteses formuladas para explicar a observação de que apenas as concentrações mais elevadas foram capazes de induzir doença. Em bactérias, o sistema de *quorum sensing* depende do acúmulo de células até um determinado limiar, quando se iniciam alguns processos que podem ser de patogênese ou latência (Liu *et al.*, 2008).

Schell (2000) indica que a concentração de  $10^9$  UFC/mL no tecido da planta é capaz de induzir a doença e a produção de fatores de patogênese como o EPS e outras enzimas. Milling *et al.* (2011) relatam que plantas de 'Hawaii 7996' inoculadas com concentrações de  $1 \times 10^7$  UFC de *R. solanacearum* por grama de tecido do caule, tiveram suas respostas de defesa fortemente ativadas pelas rotas metabólicas do ácido salicílico e etileno, enquanto que plantas suscetíveis não apresentaram resposta alguma. De acordo com os mesmos autores, o isolado UW551 de *R. solanacearum* (biovar 2) causou um nível significativo de doença na linhagem resistente 'Hawaii 7996' quando comparado com o isolado GMI1000 (biovar 3). Porém, no presente trabalho, a linhagem 'Hawaii 7996' foi desafiada com diversos outros isolados biovar 2, comprovando que o isolado CNPH-RS 488 apresenta capacidade superior de suplantar a

resistência dessa linhagem, indicando que pode ser uma característica do tipo isolado-específica.

A bactéria *R. solanacearum* continua seu desenvolvimento no tecido infectado durante a evolução da doença, levando a formação de colônias e de biofilme (Morris & Monier, 2003; Kumar *et al.*, 2015). A produção de biofilme entre os isolados avaliados oscilou, formando três grupos estatísticos distintos. A maioria dos isolados da biovar 2A (inclusive o CNPH-RS 488) apresentou baixa e/ou mais lenta produção de biofilme. Peeters *et al.* (2013) destaca a importância do biofilme para a que a doença ocorra, porém a observação realizada neste trabalho indica que a rápida produção de biofilme não está necessariamente associada com níveis elevados de virulência e/ou mais amplo perfil de virulência.

De fato, existem poucos estudos relacionando a produção de biofilme e a virulência, em especial aqueles que relacionam tempo para formação ou quantidade com a capacidade de induzir a doença (Yao & Allen, 2007). Estudos sobre mutantes defectivos para os genes de *pili* tipo IV ou EPS (em que a capacidade de adesão na superfície da célula hospedeira foi anulada) resultaram em uma perda quase completa da virulência. No entanto, esses estudos não analisaram outros fatores como o tempo para formação de biofilme e/ou quantidade de biofilme produzido (Rigano *et al.*, 2007). Kang *et al.* (2002) observaram que mutantes *pilA*, que não formam biofilme de forma similar ao tipo selvagem, são hipovirulentos. Em outros patossistemas como o do patógeno *Burkholderia pseudomallei* não foi identificada a relação entre a quantidade de biofilme produzido e virulência (Taweechaisupapong *et al.*, 2005).

Os dados de produção de biofilme e da titulação de infectividade não apresentaram uma clara associação. O isolado CNPH-RS 498, mesmo com maior produção de biofilme que o CNPH-RS 488, causou menos doença. Por sua vez, o isolado CNPH-RS 534, que agrupou com



o CNPH-RS 488 na quantidade de biofilme, causou muito menos doença, quando consideramos tanto o tempo como a incidência.

Outro fator de patogênese que pode explicar a capacidade diferencial do isolado CNPH-RS 488 é o EPS, reconhecido como essencial para o processo infectivo de *Ralstonia* (Milling *et al.*, 2011; Murthy & Srinivas, 2015). De acordo com a análise estatística do teste colorimétrico foram observados cinco grupos, ficando o isolado CNPH-RS 488 agrupado com outro isolado de elevada virulência, o CNPH-RS 461. No entanto, ambos foram caracterizados com uma produção de EPS de quantidade intermediária. Esse dado pode indicar que a capacidade diferencial de patogênese pode estar associada com a composição do EPS e não com a quantidade produzida ou velocidade de produção. Embora o CER apresente uma extrema diversidade, o EPS (que representa a principal matriz do biofilme) se apresenta conservado na sua composição, o que tem permitindo o uso de anticorpos específicos com abrangência suficiente para cobrir, supostamente, toda a diversidade dentro do CER (Alvarez, 2004). Segundo Milling *et al.* (2011), o EPS tem função de proteção contra os sistemas de defesa da planta, evitando a detecção do patógeno pela hospedeira. No entanto, o EPS apresenta um efeito contrário na fonte de resistência ‘Hawaii 7996’ uma vez que sua presença aciona as respostas de defesa dessa linhagem (Milling *et al.*, 2011). Diferenças entre os isolados avaliados não foram identificadas, sugerindo que a composição e não o volume produzido de EPS pode ser determinante para o reconhecimento e ativação dos processos de defesa por parte da linhagem resistente ‘Hawaii 7996’. Porém, somente uma análise qualitativa por meio da técnica de espectrometria de massa poderá responder se diferenças na capacidade de patogênese do isolado CNPH-RS 488 estão relacionadas com a composição do EPS.

Como descrito anteriormente, as alterações estruturais do EPS são pouco prováveis devido à sua elevada conservação evolucionária. Dessa forma, é possível que, como citado por Milling *et al.* (2011), outros elicitores estejam envolvidos. Essa hipótese é plausível do ponto

de vista de variabilidade genômica entre isolados uma vez que diferenças foram observadas em cerca de 1000 genes entre análises comparativas de um isolado da biovar 3 (GMI1000) e um isolado da biovar 2 (UW551). Outro obstáculo no estudo do EPS é o fato de ser geneticamente regulado por um *operon* de 18 kb que envolve a mobilização de diversas enzimas que processam os seus carboidratos estruturais (Huang & Schell, 1995).

O EPS tem sido pobremente estudado, se limitando à análise da quantidade produzida (McGarvey *et al.*, 1999), porém, o fato de ser o principal elicitor de defesa no tomateiro ‘Hawaii 7996’ à infecção do CER demanda estudos adicionais (Alvarez, 2004; Milling *et al.*, 2011). Por outro lado, os dados obtidos no presente estudo indicam, de modo geral, a necessidade de serem explorados outros fatores de virulência e não somente o biofilme ou a produção de EPS. A virulência e fatores de patogenicidade do CER são considerados complexos, dificultando um amplo entendimento do processo.

O meio semi-seletivo SMART permitiu apenas o crescimento de isolados da biovar 3. Já as biovars 1, 2A, 2T não se desenvolveram, confirmando que o uso desse meio de cultura para as condições brasileiras não irá ter sucesso assegurado na recuperação dos isolados do CER presentes no país. Outros meios que usam a mesma composição de antibióticos ou, em alguns casos, mais que os três usados como o SMSA (Elphinstone *et al.*, 1996) e CIPEB (Priou *et al.*, 2006), também não serão capazes de permitir o isolamento da bactéria devido à similaridade de composição com o meio semi-seletivo SMART.

Os meios semi-seletivos ajudam na recuperação da bactéria, já que muitas vezes o objetivo é a obtenção de um isolado para testes futuros, tanto bioquímicos como para emprego em sistemas de seleção de fontes resistência em germoplasma de plantas hospedeiras. Para o teste de antibiograma, os antibióticos clindamicina e oxacilina, por não terem efeito inibitório algum nos isolados usados, podem ser potencialmente empregados em meios seletivos. A

penicilina e nitrofurantoina não inibiram alguns isolados, e podem, desta forma, ter suas concentrações ajustadas para serem também aplicados em meios semi-seletivos que visem o isolamento de um número mais amplo de isolados do CER. O cloranfenicol, geralmente usado para inibir o desenvolvimento de fungos nos meios semi-seletivos, é também usado nos meios SMSA, SMART e CIPEB. No antibiograma conduzido no presente trabalho, o cloranfenicol causou inibição aos isolados empregados, sendo um dos prováveis agentes que explicam o feito inibitório do meio semi-seletivo SMART aos isolados brasileiros do CER. Para o isolado CNPH-RS 488 e os demais da biovar 2A, foram observadas diferenças nos antibióticos que não inibiram seu desenvolvimento, como o ocorrido com cefalotina e ampicilina, indicando que esse grupo apresenta um espectro de resistência contra um número maior de antibióticos quando comparado com as demais biovars.

Para o teste com a gama de hospedeiros, as espécies foram selecionadas por não serem relatadas como suscetíveis a isolados da biovar 2A. O jiló, berinjela, amendoim e gergelim são geralmente associados à suscetibilidade à biovar 3 (Collonnier *et al.*, 2001; Gousset *et al.*, 2005; Ivey *et al.*, 2007; Jeong *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2009), assim como o *Tagetes* à biovar 1 (Mondal *et al.*, 2011). O emprego de plantas de *Tagetes* tem sido relatado como uma possível estratégia no controle da murcha bacteriana via rotação em solos infestados (Terblanche & De Villiers, 1998; Hooks *et al.*, 2010). No entanto, a suscetibilidade de acessos de *Tagetes* já foi confirmada contra isolados da biovar 2 (Pradhanang *et al.*, 2000). No presente trabalho, o teste do copo em *Tagetes* indicou que as plantas assintomáticas não apresentaram elevadas concentrações da bactéria como ocorre em infecções latentes em gerânios.

Isolados da biovar 2A, ao contrário daqueles da biovar 1 e biovar 3, apresentam uma menor gama de plantas hospedeiras (Cellier & Prior, 2010), destacando-se principalmente as perdas que pode causar em batata, tomate e potencial para infecções latentes em gerânio e batata (Swanson *et al.*, 2007). O isolado CNPH-RS 488 apresentou uma gama de hospedeiras mais

restrita do que os isolados da biovar 1 e biovar 3, não sendo capaz de causar murcha em plantas de amendoim, *Tagetes* e gergelim, que são consideradas hospedeiras não convencionais no Brasil. Mesmo existindo relatos da biovar 2 causando murcha em *Tagetes*, isso não foi observado com o isolado CNPH-RS 488 (Pradhanang *et al.*, 2000). No caso de tomate, jiló e berinjela (especialmente essas duas últimas hospedeiras) aparentemente são mais suscetíveis aos isolados da biovar 3. No entanto, o isolado CNPH-RS 488 causou o mesmo índice de murcha que os isolados das biovars 1 e 3 nas três hospedeiras. Foram também observados níveis maiores de resistência no jiló, como previamente descrito por Lopes *et al.* (2015), que sugerem o seu potencial uso como porta-enxerto. Esse resultado serve como alerta para o não uso de solanáceas mesmo para áreas com a presença de isolados de *R. solanacearum* (previamente raça 3/biovar 2). O fato do isolado GMI1000 (biovar 3) não ter causado sintomas, pode ser explicado pela perda de virulência devido ao seu armazenamento por longos períodos (Genin *et al.*, 2005).

## 5. CONCLUSÕES

- O isolado CNPH-RS 488, embora pertença à raça 3/biovar 2A, normalmente associada à cultura da batata, representa uma nova variante de isolados de *R. solanacearum*, com elevada virulência e apresentando a capacidade de superação de fatores da resistência em tomate;
- O isolado CNPH-RS 488 foi capaz de superar a resistência da linhagem ‘Hawaii 7996’ e conseguiu (em comparação com os demais isolados de biovar 2) induzir sintomas de murcha mais rapidamente, tanto para o próprio ‘Hawaii 7996’ como também para a linhagem suscetível ‘L390’;
- Produção de EPS e biofilme não apresentaram correlações claras com o perfil de virulência mais amplo do isolado CNPH-RS 488;

- Isolados brasileiros do CER, assim como o foco desse estudo, o isolado CNPH-RS 488, apresentaram seu crescimento inibido em meios semi-seletivos como SMART e SMSA, indicando não ser adequado para o isolamento nas condições brasileiras;
- O perfil de antibiograma indica a possibilidade de desenvolvimento de um meio mais eficiente combinando os antibióticos oxacilina, clindamicina e nitrofurantoina, em associação com outros antibióticos;
- Os isolados com perfil de virulência similares aos observados para o isolado CNPH-RS 488 além de oferecerem potenciais riscos à produção de tomate, devido à capacidade de infectar as principais fontes de resistência nas duas hospedeiras, também têm capacidade de infectar distintas plantas hospedeiras consideradas mais resistentes à raça 3/biovar 2, tais como jiló e berinjela.

## **6. PERSPECTIVAS**

- Sequenciar o genoma completo do isolado CNPH-RS 488;
- Buscar entre os efetores possíveis respostas para a suplantação de resistência;
- Realizar um estudo qualitativo da composição do EPS do isolado CNPH-RS 488.

## **7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ALVAREZ, A.M. 2004. Integrated approaches for detection of plant pathogenic bacteria and diagnosis of bacterial diseases. *Annual Review of Phytopathology* 42:339-366.
- BI-HAO, C.; JIAN-JUN, L.; YONG, W. & GUO-JU, C. 2009. Inheritance and identification of SCAR marker linked to bacterial wilt-resistance in eggplant. *African Journal of Biotechnology* 8.
- BRUMBLEY, S.M. & DENNY, T.P. 1990. Cloning of wild-type *Pseudomonas solanacearum* *phcA*, a gene that when mutated alters expression of multiple traits that contribute to virulence. *Journal of Bacteriology* 172:5677-5685.
- BUDDENHAGEN, I.W.; SEQUEIRA, L. & KELMAN, A. 1962. Designation of races of *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 52:726-730.

- CARDOSO, S.C.; SOARES, A.C.F.; BRITO, A.D.S.; CARVALHO, L.A.D. & LEDO, C.A.D.S. 2006. Potential of Hawaii 7996 hybrid as rootstock for tomato cultivars. *Bragantia* 65:89-96.
- CARMEILLE, A.; CARANTA, C.; DINTINGER, J.; PRIOR, P.; LUISETTI, J. & BESSE, P. 2006a. Identification of QTLs for *Ralstonia solanacearum* race 3-phyloptype II resistance in tomato. *Theoretical and Applied Genetics* 113:110-121.
- CARMEILLE, A.; PRIOR, P.; KODJA, H.; CHIROLEU, F.; LUISETTI, J. & BESSE, P. 2006b. Evaluation of resistance to race 3, biovar 2 of *Ralstonia solanacearum* in tomato germplasm. *Journal of Phytopathology* 154:398-402.
- CELLIER, G. & PRIOR, P. 2010. Deciphering phenotypic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains pathogenic to potato. *Phytopathology* 100:1250-1261.
- CHAMPOISEAU, P.G.; JONES, J.B. & ALLEN, C. 2009. *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 causes tropical losses and temperate anxieties. *Plant Health Progress* 10:1-10.
- COHAN, F.M. 2006. Towards a conceptual and operational union of bacterial systematics, ecology, and evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 361:1985-1996.
- COLLONNIER, C.; MULYA, K.; FOCK, I.; MARISKA, I.; SERVAES, A.; VEDEL, F.; SILJAK-YAKOVLEV, S.; SOUVANNAVONG, V.; DUCREUX, G. & SIHACHAKR, D. 2001. Source of resistance against *Ralstonia solanacearum* in fertile somatic hybrids of eggplant (*Solanum melongena* L.) with *Solanum aethiopicum* L. *Plant Science* 160:301-313.
- DEBERDT, P.; GOZÉ, E.; CORANSON - BEAUDU, R.; PERRIN, B.; FERNANDES, P.; LUCAS, P. & RATNADASS, A. 2015. *Crotalaria spectabilis* and *Raphanus sativus* as Previous Crops Show Promise for the Control of Bacterial Wilt of Tomato Without Reducing Bacterial Populations. *Journal of Phytopathology* 163:377-385.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P. & SMITH, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry* 28:350-356.
- ELPHINSTONE, J.G.; HENNESSY, J.; WILSON, J.K. & STEAD, D.E. 1996. Sensitivity of different methods for the detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tuber extracts. *EPPO Bulletin* 26:663-678.
- ELSHARKAWY, M.M.; NAKATANI, M.; NISHIMURA, M.; ARAKAWA, T.; SHIMIZU, M. & HYAKUMACHI, M. 2015. Control of tomato bacterial wilt and root-knot diseases by *Bacillus thuringiensis* CR-371 and *Streptomyces avermectinius* NBRC14893. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B—Soil & Plant Science* 5:1-6.

- FEGAN, M. & PRIOR, P. 2005. 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*. 1 ed. APS Press. Estados Unidos. p. 449-461.
- GENIN, S. 2010. Molecular traits controlling host range and adaptation to plants in *Ralstonia solanacearum*. *New Phytologist* 187:920-928.
- GENIN, S.; BRITO, B.; DENNY, T.P. & BOUCHER, C. 2005. Control of the *Ralstonia solanacearum* Type III secretion system (Hrp) genes by the global virulence regulator PhcA. *FEBS letters* 579:2077-2081.
- GENIN, S. & DENNY, T.P. 2012. Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Annual Review of Phytopathology* 50:67-89.
- GOUSSET, C.; COLLONNIER, C.; MULYA, K.; MARISKA, I.; ROTINO, G.L.; BESSE, P.; SERVAES, A. & SIHACHAKR, D. 2005. *Solanum torvum*, as a useful source of resistance against bacterial and fungal diseases for improvement of eggplant (*S. melongena* L.). *Plant Science* 168:319-327.
- GRIMAULT, V.; PRIOR, P. & ANAIS, G. 1995. A monogenic dominant resistance of tomato to bacterial wilt in Hawaii 7996 is associated with plant colonization by *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Phytopathology* 143:349-352.
- HAYWARD, A.C. 1991. Biology and Epidemiology of a bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology* 29:14.
- HAYWARD, A.C. 1994. The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. In: HAYWARD, A.C. & HARTMAN, G.L. eds. *Pseudomonas solanacearum: The disease and its causative agent*. 1 ed. CABI International. Reino Unido. p. 101-115.
- HONG, J.C.; MOMOL, M.T.; JONES, J.B.; JI, P.; OLSON, S.M.; ALLEN, C.; PEREZ, A.; PRADHANANG, P. & GUVEN, K. 2008. Detection of *Ralstonia solanacearum* in irrigation ponds and aquatic weeds associated with the ponds in North Florida. *Plant Disease* 92:1674-1682.
- HOOKS, C.R.R.; WANG, K.-H.; PLOEG, A. & MCSORLEY, R. 2010. Using marigold (*Tagetes* spp.) as a cover crop to protect crops from plant-parasitic nematodes. *Applied Soil Ecology* 46:307-320.
- HUANG, J. & SCHELL, M. 1995. Molecular characterization of the eps gene cluster of *Pseudomonas solanacearum* and its transcriptional regulation at a single promoter. *Molecular Microbiology* 16:977-989.
- HYAKUMACHI, M.; NISHIMURA, M.; ARAKAWA, T.; ASANO, S.; YOSHIDA, S.; TSUSHIMA, S. & TAKAHASHI, H. 2013. *Bacillus thuringiensis* suppresses bacterial wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum* with systemic induction of defense-related gene expression in tomato. *Microbes and Environments* 28:128-134.

- IMAZAKI, I. & NAKAHO, K. 2010. Pyruvate-amended modified SMSA medium: improved sensitivity for detection of *Ralstonia solanacearum*. *Journal of General Plant Pathology* 76:52-61.
- IVEY, M.L.L.; GARDENER, B.B.M.; OPINA, N. & MILLER, S.A. 2007. Diversity of *Ralstonia solanacearum* infecting eggplant in the Philippines. *Phytopathology* 97:1467-1475.
- JEONG, Y.; KIM, J.; KANG, Y.; LEE, S. & HWANG, I. 2007. Genetic diversity and distribution of Korean isolates of *Ralstonia solanacearum*. *Plant Disease* 91:1277-1287.
- JIANWEI, L.; HUIFANG, J.; XIAOPING, R.; XIAOJIE, Z. & BOSHO, L. 2010. Identification and molecular traits of ICRISAT mini core collection of peanut species with resistance to bacterial wilt. *Chinese Agriculture Science Bulletin* 26:47-51.
- KANG, Y.; LIU, H.; GENIN, S.; SCHELL, M.A. & DENNY, T.P. 2002. *Ralstonia solanacearum* requires type 4 pili to adhere to multiple surfaces and for natural transformation and virulence. *Molecular Microbiology* 46:427-437.
- KAWANISHI, T.; SHIRAISHI, T.; OKANO, Y.; SUGAWARA, K.; HASHIMOTO, M.; MAEJIMA, K.; KOMATSU, K.; KAKIZAWA, S.; YAMAJI, Y. & HAMAMOTO, H. 2011. New detection systems of bacteria using highly selective media designed by SMART: selective medium-design algorithm restricted by two constraints. *PloS One* 6:e16512.
- KELMAN, A. 1954. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology* 44:693-695.
- KIM, S.G.; HUR, O.-S.; RO, N.-Y.; KO, H.-C.; RHEE, J.-H.; SUNG, J.S.; RYU, K.-Y.; LEE, S.-Y. & BAEK, H.J. 2016. Evaluation of Resistance to *Ralstonia solanacearum* in Tomato Genetic Resources at Seedling Stage. *The Plant Pathology Journal* 32:58-64.
- KUMAR, J.S.; UMESHA, S.; PRASAD, K.S. & NIRANJANA, P. 2016. Detection of Quorum Sensing Molecules and Biofilm Formation in *Ralstonia solanacearum*. *Current Microbiology* 72:297-305.
- LEBEAU, A.; DAUNAY, M.C.; FRARY, A.; PALLOIX, A.; WANG, J.F.; DINTINGER, J.; CHIROLEU, F.; WICKER, E. & PRIOR, P. 2011. Bacterial wilt resistance in tomato, pepper, and eggplant: genetic resources respond to diverse strains in the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Phytopathology* 101:154-165.
- LIU, H.; COULTHURST, S.J.; PRITCHARD, L.; HEDLEY, P.E.; RAVENSDALE, M.; HUMPHRIS, S.; BURR, T.; TAKLE, G.; BRURBERG, M.-B. & BIRCH, P.R.J. 2008. Quorum sensing coordinates brute force and stealth modes of infection in the plant pathogen *Pectobacterium atrosepticum*. *PLoS Pathogens* 4:e1000093.



- LIU, L.; SUN, C.; LIU, S.; CHAI, R.; HUANG, W.; LIU, X.; TANG, C. & ZHANG, Y. 2015. Bioorganic Fertilizer Enhances Soil Suppressive Capacity against Bacterial Wilt of Tomato. *PloS One* 10:e012304.
- LIU, L.; SUN, C.; LIU, X.; HE, X.; LIU, M.; WU, H.; TANG, C.; JIN, C. & ZHANG, Y. 2016. Effect of calcium cyanamide, ammonium bicarbonate and lime mixture, and ammonia water on survival of *Ralstonia solanacearum* and microbial community. *Scientific reports* 6.
- LOPES, C.A. 2005. Murchadeira da batata. 1 Ed. Associação Brasileira da Batata. Itapetininga.
- LOPES, C.A. 2015. Bacterial Wilt - a disease threatening disease of tomato cultivated under warm temperatures. *Comunicado Técnico* 109:4.
- LOPES, C.A.; BOITEUX, L.S. & ESCHEMBAK, V. 2015. Eficácia relativa de porta-enxertos comerciais de tomateiro no controle da murcha-bacteriana. *Horticultura Brasileira* 33:125-130.
- MALAVOLTA, J.; BERIAM, L.; ALMEIDA, I.; RODRIGUES NETO, J. & ROBBS, C. 2008. Bactérias fitopatogênicas assinaladas no Brasil: uma atualização. *Summa Phytopathologica* 34:9-87.
- MCGARVEY, J.A.; DENNY, T.P. & SCHELL, M.A. 1999. Spatial-temporal and quantitative analysis of growth and EPS I production by *Ralstonia solanacearum* in resistant and susceptible tomato cultivars. *Phytopathology* 89:1233-1239.
- MILLING, A.; BABUJEE, L. & ALLEN, C. 2011. *Ralstonia solanacearum* extracellular polysaccharide is a specific elicitor of defense responses in wilt-resistant tomato plants. *PloS One* 6:e15853.
- MONDAL, B.; BHATTACHARYA, I. & KHATUA, D.C. 2011. Crop and weed host of *Ralstonia solanacearum* in West Bengal. *Journal of Crop and Weed* 7:195-199.
- MORI, Y.; INOUE, K.; IKEDA, K.; NAKAYASHIKI, H.; HIGASHIMOTO, C.; OHNISHI, K.; KIBA, A. & HIKICHI, Y. 2015. The vascular plant pathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum* produces biofilms required for its virulence on the surfaces of tomato cells adjacent to intercellular spaces. *Molecular Plant Pathology* 17:890-902.
- MORRIS, C.E. & MONIER, J.-M. 2003. The ecological significance of biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 41:429-453.
- MURTHY, K.N. & SRINIVAS, C. 2015. Extraction and characterization of extracellular polysaccharide from *Ralstonia solanacearum* causing wilt of tomato. *International Journal of Agricultural Science and Research (IJASR)* 5:81-92.

- NAKAHO, K.; INOUE, H.; TAKAYAMA, T. & MIYAGAWA, H. 2004. Distribution and multiplication of *Ralstonia solanacearum* in tomato plants with resistance derived from different origins. *Journal of General Plant Pathology* 70:115-119.
- O'TOOLE, G.A. & KOLTER, R. 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Molecular Microbiology* 28:449-461.
- PEETERS, N.; GUIDOT, A.; VAILLEAU, F. & VALLS, M. 2013. *Ralstonia solanacearum*, a widespread bacterial plant pathogen in the post - genomic era. *Molecular Plant Pathology* 14:651-662.
- PLENER, L.; BOISTARD, P.; GONZÁLEZ, A.; BOUCHER, C. & GENIN, S. 2012. Metabolic adaptation of *Ralstonia solanacearum* during plant infection: a methionine biosynthesis case study. *PloS One* 7:e36877-e36877.
- PRADHANANG, P.M.; ELPHINSTONE, J.G. & FOX, R.T.V. 2000. Identification of crop and weed hosts of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 in the hills of Nepal. *Plant Pathology* 49:403-413.
- PRIOU, S.; GUTARRA, L. & ALEY, P. 2006. An improved enrichment broth for the sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* (biovars 1 and 2A) in soil using DAS-ELISA. *Plant Pathology* 55:36-45.
- RICA, C. 1983. A new selective medium for *Pseudomonas solanacearum*. *Plant Disease* 67:1084-1088.
- RIGANO, L.A.; SICILIANO, F.; ENRIQUE, R.; SENDÍN, L.; FILIPPONE, P.; TORRES, P.S.; QÜESTA, J.; DOW, J.M.; CASTAGNARO, A.P. & VOJNOV, A.A. 2007. Biofilm formation, epiphytic fitness, and canker development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20:1222-1230.
- RIVARD, C.L.; O'CONNELL, S.; PEET, M.M.; WELKER, R.M. & LOUWS, F.J. 2012. Grafting tomato to manage bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* in the southeastern United States. *Plant Disease* 96:973-978.
- SAFNI, I.; CLEENWERCK, I.; DE VOS, P.; FEGAN, M.; SLY, L. & KAPPLER, U. 2014. Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. and *R. solanacearum* phylotype I and III strains as *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64:3087-3103.

- SANTIAGO, T.R.; LOPES, C.A.; CAETANO - ANOLLÉS, G. & MIZUBUTI, E.S.G. 2016. Phylotype and sequevar variability of *Ralstonia solanacearum* in Brazil, an ancient center of diversity of the pathogen. *Plant Pathology*.
- SCHELL, M.A. 2000. Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia solanacearum* by an elaborate sensory network. *Annual Review of Phytopathology* 38:263-292.
- SCOTT, J.W.; WANG, J.F. & HANSON, P.M. Breeding tomatoes for resistance to bacterial wilt, a global view. *Proceedings of the I International Symposium on Tomato Diseases* 695, 2004, 161-172.
- SINGH, D.; SINHA, S.; YADAV, D.K. & CHAUDHARY, G. 2014. Detection of *Ralstonia solanacearum* from asymptomatic tomato plants, irrigation water, and soil through non-selective enrichment medium with hrp gene-based bio-PCR. *Current Microbiology* 69:127-134.
- SOOD, A.K. & KUMAR, P. 2015. Evaluation of essential oils against *Ralstonia solanacearum* causing bacterial wilt of solanaceous crops. *Plant Disease Research* 30:67-72.
- STRANGE, R.N. & SCOTT, P.R. 2005. Plant disease: a threat to global food security. *Phytopathology* 43:83-116.
- SWANSON, J.K.; MONTES, L.; MEJIA, L. & ALLEN, C. 2007. Detection of latent infections of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 in geranium. *Plant Disease* 91:828-834.
- TAWEECHAISUPAPONG, S.; KAEWPA, C.; ARUNYANART, C.; KANLA, P.; HOMCHAMPA, P.; SIRISINHA, S.; PROUNGVITAYA, T. & WONGRATANACHEEWIN, S. 2005. Virulence of *Burkholderia pseudomallei* does not correlate with biofilm formation. *Microbial Pathogenesis* 39:77-85.
- TERBLANCHE, J. & DE VILLIERS, D.A. 1998. The suppression of *Ralstonia solanacearum* by marigolds. *In. Bacterial Wilt Disease*. 1 ed. Springer. Alemanha. p. 325-331.
- VALLS, M.; GENIN, S. & BOUCHER, C. 2006. Integrated regulation of the type III secretion system and other virulence determinants in *Ralstonia solanacearum*. *PLoS Pathogens* 2:e82-e99.
- VAN ELSAS, J.D.; KASTELEIN, P.; VAN BEKKUM, P.; VAN DER WOLF, J.M.; DE VRIES, P.M. & VAN OVERBEEK, L.S. 2000. Survival of *Ralstonia solanacearum* biovar 2, the causative agent of potato brown rot, in field and microcosm soils in temperate climates. *Phytopathology* 90:1358-1366.
- WAIURURI, C.K.; VAN DER WAALS, J.E.; VAN SCHALKWYK, A. & THERON, J. 2012. *Ralstonia solanacearum* needs Flp pili for virulence on potato. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25:546-556.

- WANG, J.-F.; OLIVIER, J.; THOQUET, P.; MANGIN, B.; SAUVIAC, L. & GRIMSLEY, N.H. 2000. Resistance of tomato line Hawaii7996 to *Ralstonia solanacearum* Pss4 in Taiwan is controlled mainly by a major strain-specific locus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13:6-13.
- WICKER, E.; GRASSART, L.; CORANSON-BEAUDU, R.; MIAN, D.; GUILBAUD, C.; FEGAN, M. & PRIOR, P. 2007. *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential. *Applied and Environmental Microbiology* 73:6790-6801.
- WICKER, E.; LEFEUVRE, P.; DE CAMBIAIRE, J.-C.; LEMAIRE, C.; POUSSIER, S. & PRIOR, P. 2012. Contrasting recombination patterns and demographic histories of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from MLSA. *The ISME Journal* 6:961-974.
- WU, K.; YUAN, S.; XUN, G.; SHI, W.; PAN, B.; GUAN, H.; SHEN, B. & SHEN, Q. 2015. Root exudates from two tobacco cultivars affect colonization of *Ralstonia solanacearum* and the disease index. *European Journal of Plant Pathology* 141:667-677.
- XU, J.; PAN, Z.; PRIOR, P.; XU, J.; ZHANG, Z.; ZHANG, H.; ZHANG, L.; HE, L. & FENG, J. 2009. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains from China. *European Journal of Plant Pathology* 125:641-653.
- YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; YANO, I.; HOTTA, H. & NISHIUCHI, Y. 1995. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. *Microbiology and Immunology* 39:897-904.
- YADESSA, G.B.; VAN BRUGGEN, A.H.C. & OCHO, F.L. 2010. Effects of different soil amendments on bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* and on the yield of tomato. *Journal of Plant Pathology* 92:439-450.
- YAMADA, T.; KAWASAKI, T.; NAGATA, S.; FUJIWARA, A.; USAMI, S. & FUJIE, M. 2007. New bacteriophages that infect the phytopathogen *Ralstonia solanacearum*. *Microbiology* 153:2630-2639.
- YAMAMOTO, S.; SHIRAISHI, S.; KAWAGOE, Y.; MOCHIZUKI, M. & SUZUKI, S. 2015. Impact of *Bacillus amyloliquefaciens* S13 - 3 on control of bacterial wilt and powdery mildew in tomato. *Pest Management Science* 71:722-727.
- YAO, J. & ALLEN, C. 2007. The plant pathogen *Ralstonia solanacearum* needs aerotaxis for normal biofilm formation and interactions with its tomato host. *Journal of Bacteriology* 189:6415-6424.
- ZHANG, Y. & QIU, S. 2016. Phylogenomic analysis of the genus *Ralstonia* based on 686 single-copy genes. *Antonie van Leeuwenhoek* 109:71-82.

ZHAO, Y.; ZHANG, C.; CHEN, H.; YUAN, M.; NIPPER, R.; PRAKASH, C.S.; ZHUANG, W. & HE, G. 2016. QTL mapping for bacterial wilt resistance in peanut (*Arachis hypogaea L.*). *Molecular Breeding* 36:1-11.

# CAPÍTULO 2

---

---

**SISTEMA PARA IDENTIFICAÇÃO DE BIOVARES VIA PCR  
EMPREGANDO INICIADORES ESPECÍFICOS DERIVADOS DA  
ANÁLISE GENÔMICA COMPARATIVA DE ISOLADOS DO  
COMPLEXO DE ESPÉCIES DE *Ralstonia***

## **Sistema para identificação de biovars via PCR empregando iniciadores específicos derivados da análise genômica comparativa de isolados do Complexo de Espécies de *Ralstonia***

### **RESUMO**

O complexo de espécies de *Ralstonia* (recentemente subdividido em três espécies, *R. solanacearum*, *R. pseudosolanacearum* e *R. syzygii*) apresenta grande diversidade, com variadas subdivisões infraespecíficas, como raças, biovars, filotipos e sequevares. A classificação em biovars tem se mostrado útil na seleção de isolados para uso em sistemas de avaliação de germoplasma dentro dos programas de melhoramento genético do tomateiro e de distintas plantas hospedeiras. Atualmente as cinco biovars existentes são determinadas por testes em meio de cultura. Visando agilizar e simplificar o processo, o objetivo desse capítulo foi desenvolver um sistema de marcadores para cada biovar, utilizando *primers* específicos que foram derivados da informação de sequência de marcadores RAPD. A estratégia de *bulk segregant analysis* permitiu a identificação de marcadores do tipo biovar-específicos para um conjunto de biovars presentes no Brasil. Dez isolados por biovar foram agrupados nos “bulks” para as análises com o sistema de marcadores RAPD. Uma coleção de 340 *primers* RAPD foi utilizada e 11 mostraram polimorfismos com potencial valor diagnóstico. Desses, quatro *primers* que geraram marcadores estáveis foram selecionados (OP-A7, OP-I18, OP-J1 e OP-K10). A informação de sequência destes amplicons polimórficos foi utilizada para o desenho de seis *primers* do tipo SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*)(J1-B1-B, SCAR-i18-B2A, SCAR-A7-B3, A7-B3, SCAR-K10-B3, K10-B3). Além disso, a estratégia de subtração *in silico* associada a um conjunto de genomas completos de *R. pseudosolanacearum* permitiu o desenho de *primers* específicos para a região do gene *pols* (codificador da sorbitol desidrogenase), que geraram marcadores exclusivos para isolados de *R. pseudosolanacearum*. Esse conjunto de *primers* apresentou potencial para identificação das biovars 1 (J1-B1-B-274

pb) e 2A (SCAR-i18-B2A). Para a biovar 2T nenhum dos *primers* avaliados apresentou especificidade.

**Palavras-chave:** *primers*, iniciadores específicos, biovar, murcha bacteriana.



**A biovar-specific identification system based on PCR employing primers derived from comparative genomic analysis of isolates from the *Ralstonia* species complex**

**ABSTRACT**

The *Ralstonia solanacearum* species complex (recently subdivided into three species, *R. solanacearum*, *R. pseudosolanacearum*, and *R. syzygii*) displays a large diversity, with infraspecific subdivisions such as races, biovars, phylotypes, and sequevars. The classification in biovars has been useful for the selection of isolates for use in germplasm evaluation systems within breeding programs of tomatoes and other species. Currently, the five biovars are determined by tests on culture media, which are cumbersome and time-consuming. The objective of this chapter was to develop a biovar-specific molecular marker system aiming to simplify the diagnostic process. Ten isolates of each biovar were grouped in bulks for the RAPD markers screening. A collection of 340 RAPD primers was used and 11 primers revealed polymorphisms and therefore showed potential diagnostic value of biovars. From those, four primers (OP-A7, OP-i18, OP-J1, OP-K10) generated stable markers and were selected for further analyses. The information derived from sequencing a subgroup of polymorphic RAPD amplicons was initially used to generate biovar-specific primers. The sequence information of these polymorphic amplicons was used for the design of seven SCAR primers (J1-B1-B, SCAR-i18-B2A, SCAR-A7-B3, A7-B3, SCAR-K10-B3, and K10-B3). In addition, an *in silico* subtraction strategy using genomic information from a set of complete genome sequences of *R. pseudosolanacearum* allowed the design of *polS* (sorbitol dehydrogenase) specific primers, which generated specific markers for *R. pseudosolanacearum* isolates. The set of primers displayed potential for identification of biovar 1 (J1-B1-B-274 pb) and biovar 2A (SCAR-i18-B2A) isolates. However, for biovar 2T none of the evaluated primers displayed specificity.

**Keywords:** primers, molecular marker system, biovar, diagnostic, bacterial wilt.

## 1. INTRODUÇÃO

O complexo de espécies de *Ralstonia* (CER) representa um grupo cosmopolita de patógenos de solo bastante diversificado e adaptado a uma ampla gama de plantas hospedeiras (Hayward, 1994a; Fegan & Prior, 2005). A diversidade fenotípica de isolados do CER foi inicialmente catalogada utilizando critérios de círculo de hospedeiras ou raças (Buddenhagen *et al.*, 1962) e bioquímicos (= biovares) (Hayward, 1964). O sistema de biovares discrimina variantes do CER de acordo com a capacidade dos diferentes isolados de produzir gás a partir de nitrato e de oxidar um conjunto de dissacarídeos (maltose, lactose e celobiose) e de alcoóis (manitol, dulcitol e sorbitol) (Hayward, 1991; Hayward, 1994b). Em termos mundiais, seis biovares foram identificadas até o presente momento (Horita & Tsuchiya, 2001; Wicker *et al.*, 2007), sendo que algumas apresentam distribuição cosmopolita e outras apresentam distribuição geográfica e/ou ecológica mais restrita (Hayward, 1994a; Hayward, 1994b).

O ensaio de determinação de biovares foi inicialmente empregado como um teste adicional de laboratório visando agrupar isolados de *R. solanacearum* (Hayward, 1994a; Hayward, 1994b). Embora de execução laboratorial demorada, onerosa e trabalhosa, o sistema de classificação de biovares tem se mostrado muito informativo no ponto de vista prático, revelando associações com características peculiares dos diferentes isolados, tais como padrões de proteínas de membrana, nichos ecológicos, gama de plantas hospedeiras e distribuição geográfica (Dristig & Dianese, 1990; Prior *et al.*, 1990; Hayward, 1994b; Lopes *et al.*, 1994; Netto *et al.*, 2003).

No Brasil, o sistema de classificação de biovares tem se mostrado igualmente informativo, revelando interessantes correlações/associações com aspectos ecológicos, gama de plantas hospedeiras e perfil de virulência. Por exemplo, isolados de raça 1/biovar 1 apresentam maior incidência e severidade em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) (Takatsu & Lopes, 1997), além disso, isolados da biovar 1 têm a maior gama de hospedeiras entre todas as

seis biovares caracterizadas (Norman *et al.*, 2009). Outra característica dos isolados da raça 1/biovar 1 é o fato de eles englobarem, de maneira majoritária, o grupo de isolados nativos dos solos do ‘Cerrado’ brasileiro (Lopes, 2005).

Por sua vez, os isolados da raça 3/biovar 2A estão associados à capacidade de causar murcha em temperaturas mais amenas (25°C) quando comparados com isolados da biovar 2T, que predominam em regiões mais quentes (Lopes, 2005). As gamas de hospedeiras de isolados das biovares 2A e 2T também divergem. Isolados da biovar 2T têm sido obtidos de berinjela e de eucalipto que, no entanto, não são hospedeiras comumente infectadas por isolados da biovar 2A (Marques *et al.*, 2012; Santana *et al.*, 2012). A biovar 2A tem sido empregada como o principal do agente de bioterrorismo, tendo diversos marcadores moleculares disponíveis para identificação desses isolados (Fegan *et al.*, 1998; Stulberg *et al.*, 2015). Isolados da biovar 2T foram registrados pela primeira vez fora do seu provável centro de origem (Brasil), sendo relatado no Irã (Nouri *et al.*, 2009)

Isolados da raça 1/biovar 3 (atualmente *R. pseudosolanacearum*) apresentam maior virulência em espécies do gênero *Capsicum* (Lopes & Boiteux, 2004). Além disso, resultados recentes indicam que, em condições experimentais, acessos de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) são afetados por isolados da biovar 3, mas não por isolados da biovar 1 (Lopes *et al.*, 2015). A biovar 3, no Brasil, representa uma introdução de um filotipo exótico (filotipo I), uma vez que isolados dessa biovar têm como provável origem geográfica o continente asiático. Somado a isso, a baixa diversidade detectada nos isolados de biovar 3 obtidos no Brasil, indica uma introdução relativamente recente desta variante do patógeno no país (Santiago *et al.*, 2016).

A ocorrência de isolados da biovar 4 (*R. pseudosolanacearum*) não foi ainda registrada no Brasil. Isolados dessa biovar se caracterizam por serem patogênicos ao gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) (Hayward, 1994a). Em um levantamento realizado no Japão, somente

isolados das biovars 3 e 4 foram detectados, sendo caracterizados como pertencentes ao filotipo I (*R. pseudosolanacearum*). O tomateiro, a berinjela, o pimentão, a batata, a abóbora e o pepino estão entre as principais hospedeiras de isolados da biovar 3 (Horita & Tsuchiya, 2001). Os isolados da biovar 5 são os principais causadores de murcha bacteriana em amoreira e outras espécies arbóreas do gênero *Morus* (Urticales: Moraceae). Isolados dessa biovar apresentam um perfil distinto de utilização de carboidratos (He *et al.*, 1983). Isolados de biovars 3 e 4 também podem causar murcha em amoreira, porém apresentam importância secundária quando comparados aos isolados da biovar 5 (Pan *et al.*, 2013).

Devido à diversidade presente no CER, o sistema binário de diferenciação de isolados, que persistiu sendo empregado por mais de três décadas, tem se mostrado insuficiente para explicar e catalogar de maneira adequada a diversidade presente em isolados do CER (Hayward, 1994a; Horita *et al.*, 2014). Para aumentar os conhecimentos sobre a diversidade de isolados do CER, foram propostos outros sistemas de divisão do grupo, envolvendo a utilização de características fenotípicas e genotípicas (Fegan & Prior, 2005). No entanto, tais sistemas com amplas divisões descrevem a diversidade da bactéria, sem que necessariamente apresentem utilidades práticas para outros temas de pesquisa, como, por exemplo, o do controle de doenças.

A determinação dos chamados ‘filotipos’ representa um dos novos critérios de classificação do CER ao nível infraespecífico. Esse sistema incorpora as informações derivadas de marcadores moleculares obtidos por meio de um conjunto de iniciadores em PCR multiplex que amplificam a região intergênica 16S–23S ribossomal (Seal *et al.*, 1993; Fegan & Prior, 2005). Esse sistema, em combinação com a informação obtida de sequências do gene codificador da endoglucanase (*egl*) e de um segmento do gene que codifica a proteína de reparo de DNA (*MutS*), permitiu, até o presente momento, a definição de 57 variantes, denominadas de ‘sequevars’ (Fegan & Prior, 2005). No entanto, Wicker *et al.* (2012) ressaltam uma importante limitação do atual sistema de determinação de filotipos e apontam a necessidade de

empregar outros genes visando uma caracterização mais adequada dos isolados. Um dos principais argumentos é o fato de que gene codificador da endoglucanase apresenta taxas de recombinação mais altas que outros genes [por exemplo os do tipo *housekeeping* tais como o *hrp* (*hipersensitive response and pathogenesis*)] o que dificulta seu emprego em estudos de diversidade e de inferências filogenéticas (Wicker *et al.*, 2012).

O sistema de marcadores RAPD (*R*andomly *A*mplified *P*olymorphic *D*NA) apresenta uma série de vantagens para estudos de diversidade genética que incluem simplicidade de execução e reduzido aporte tecnológico. Além disso, esse sistema não necessita de conhecimento prévio da sequência ou do genoma em estudo (Williams *et al.*, 1990). O sistema de marcadores RAPD foi previamente utilizado em estudos de diversidade do CER gerando os marcadores específicos para isolados da raça 3/biovar 2 (Opina *et al.*, 1997). No entanto, foram relatados casos de inespecificidade, com ampliações também observadas em um subgrupo de isolados de *R. syzygii* e de *Blood disease* (Opina *et al.*, 1997). O sistema RAPD se mostrou uma ferramenta bastante útil em estudos de diversidade de populações de isolados de *R. solanacearum* obtidos em tomateiro em Taiwan quando comparado ao tradicional sistema REP-PCR (Jaunet & Wang, 1999). Em outro estudo, Lee & Wang (2000) desenvolveram *primers* para detecção de isolados do CER em solo a partir da informação obtida após clonagem e análise de sequência de amplicons RAPD.

A instabilidade do perfil de *amplicons* é um dos problemas associados com o sistema RAPD. Para minimizar esse problema, o desenho de *primers* específicos a partir da informação de sequência de *amplicons* RAPD tem sido empregado (Paran & Michelmore, 1993). Esta estratégia gera uma nova classe de marcadores denominados de SCAR (*S*equence *C*haracterized *A*mplified *R*egion). As principais etapas no desenvolvimento de um marcador do tipo SCAR envolvem a identificação de um iniciador que confere polimorfismo entre genótipos contrastantes para uma dada característica de interesse, seguido do isolamento e da clonagem

do *amplicon* polimórfico em um vetor bacteriano (plasmídeo). O fragmento polimórfico é então caracterizado via sequenciamento. Na etapa seguinte, iniciadores de tamanho maiores (entre 16 e 24 pares de bases), que incluem os decâmeros usados no sistema RAPD, são sintetizados e posteriormente validados para confirmar a manutenção dos polimorfismos (Paran & Michelmore, 1993). A estratégia de SCAR tem sido empregada para gerar marcadores úteis para estimar diversidade genética de fitopatógenos bacterianos (Lim *et al.*, 2009), incluindo isolados indianos do CER (Gund *et al.*, 2011; Gund *et al.*, 2013). No entanto, de acordo com o nosso conhecimento, essa estratégia não foi ainda empregada para desenvolver marcadores ligados a determinação das diferentes biovars do CER.

Uma estratégia, denominada de *bulked segregant analysis* (BSA), tem sido empregada para intensificar a identificação de polimorfismos entre grupos de genótipos contrastantes (Michelmore *et al.*, 1991). Nessa estratégia, são criados grupos (*bulks*) de genótipos que compartilham um determinado fenótipo e que são então analisados geneticamente por meio de diferentes sistemas de marcadores. O emprego da estratégia de BSA foi indicado para aumentar a escala do processo de identificação polimorfismos e de potenciais marcadores moleculares, uma vez que a genotipagem de um grande número de amostras individuais tem um maior custo e demanda um tempo maior de execução (Quarrie *et al.*, 1999).

A metodologia BSA é frequentemente utilizada no melhoramento genético para identificar marcadores associados com fenótipos contrastantes (Xu *et al.*, 2016), incluindo fatores de resistência a *R. solanacearum* em diversas hospedeiras [para revisão ver Huet (2014)]. Na caracterização de microrganismos, a estratégia de BSA tem sido utilizada com sucesso na levedura *Saccharomyces cerevisiae* em combinação com sequenciamento em larga escala (Wenger *et al.*, 2010). No entanto, a estratégia BSA ainda não foi empregada para identificar marcadores moleculares associados com as biovars do CER.

A recente disponibilidade de genomas completos de isolados do CER tem permitido o alinhamento *in silico* de diferentes isolados e a identificação de regiões polimórficas com potencial utilização em sistemas de marcadores para distinguir diferentes fenótipos ou grupos taxonômicos dentro da espécie. A comparação dos genomas dos isolados GMI1000 (raça 1/biovar 3) e UW551 (raça 3/biovar 2) revelou uma região de 22 Kb que distingue biovars 3 e 4 das biovars 1 e 2 (Gabriel *et al.*, 2006). A estratégia denominada de subtração *in silico* foi também utilizada por Stulberg *et al.* (2015) resultando em um conjunto de *primers* específicos para o CER, nomeados de RsSC, e outros específicos para o agente de bioterrorismo, raça 3/biovar 2A (RsSA) e que também consegue amplificar segmentos genômicos de alguns isolados 2T (sequevar 2).

Diante da utilidade prática do sistema de caracterização de biovars no estudo da diversidade de isolados do CER, existe a demanda por um teste mais rápido e preciso na determinação destas variantes bacterianas. Neste contexto, o presente trabalho buscou associar marcadores moleculares com quatro diferentes biovars de ocorrência no território brasileiro, utilizando a técnica de BSA combinada com o uso do sistema de marcadores RAPD, sendo os *amplicons* polimórficos posteriormente convertidos em marcadores do tipo SCAR. Foram também desenvolvidos *primers* específicos gerados por análise via subtração *in silico* dos genomas alinhados das distintas biovars atualmente disponíveis no GenBank e em outras bases de dados. Genes com potencial envolvimento em enzimas associadas com os testes bioquímicos de distinguem as diferentes biovars foram utilizados como alvos iniciais nesta análise.

### **1.1. Objetivo Geral**

Diante da utilidade do sistema de caracterização de biovars no estudo da diversidade do CER, existe a demanda por um teste rápido e preciso na sua determinação. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um sistema molecular para

identificação de biovares usando *primers* específicos para cada uma das quatro biovares presentes no Brasil (1, 2A, 2T e 3).

## **1.2. Objetivos específicos**

1. Empregar a combinação do sistema de marcadores RAPD e a estratégia de *Bulked segregant analysis* (BSA) para buscar polimorfismos entre *pools* genômicos compostos por isolados representativos da diversidade presente em cada uma das quatro biovares do CER relatadas no Brasil (1, 2A, 2T e 3);
2. Sequenciar *amplicons* gerados pelo sistema de marcadores RAPD que se mostraram polimórficos e/ou exclusivos nas populações de cada biovar visando o desenvolvimento de marcadores do tipo SCAR;
3. Analisar a informação genética/genômica disponível para um conjunto de genes com potencial envolvimento em enzimas associadas com os testes bioquímicos que distinguem as diferentes biovares do CER, visando empregar essa informação no desenvolvimento de marcadores para distinção destes variantes bioquímicos;
4. Desenvolver um conjunto de *primers* específicos gerados pela combinação de análises obtidas via sistemas de marcadores moleculares e subtração *in silico* dos genomas alinhados das diversas biovares do CER disponíveis no GenBank e em outras bases de dados;
5. Desenvolver e validar esse conjunto de *primers* dentro de sistemas robustos de identificação da diferentes biovares do CER via PCR.

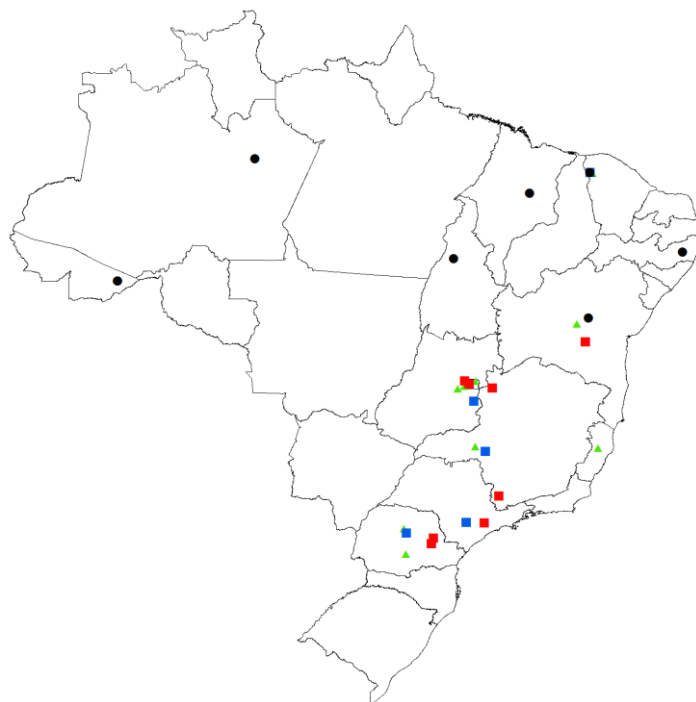
## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Seleção dos isolados para estabelecimento de *bulks* contrastantes para as diferentes biovares**

No estabelecimento de *bulks* contrastantes, dez isolados de cada uma das biovares presentes no Brasil (1, 2A, 2T e 3) foram selecionados da coleção de isolados do CER da Embrapa Hortaliças. Originalmente armazenados em tubos de criogenia de 5 mL com água



mineral, armazenados em temperatura ambiente. Visando englobar de maneira mais ampla a diversidade presente no Brasil, os isolados de cada biovar foram selecionados de distintos locais de coleta e de distintas plantas hospedeiras (**Figura 7**). Os isolados selecionados foram cultivados em meio CPG (Kelman, 1954), mantidos em câmara de crescimento por 48 horas a 28°C. Colônias típicas foram então repicadas. Após mais 48 horas nas mesmas condições, as placas foram raspadas e centrifugadas em microtubos de 2 mL e congeladas com água Milli-Q até o momento da extração de DNA. A extração de DNA seguiu o protocolo de Mahuku (2004) com modificações. As colônias descongeladas foram centrifugadas por 15 min a 10000 rpm para o descarte da água e, em seguida foi adicionado 200 µL de Tris EDTA (Tris 10 mM, EDTA 1 mM), 30 µL de SDS (20%) e 10 µL de Proteinase K (0,02 g/mL), com homogeneização por meio de um vortex e 40 min em banho maria. Foram adicionados 250 µL de acetato de amônio 7,5 M, com nova homogeneização vortex e manutenção à -20°C por 10 min. A suspensão foi centrifugada por 20 min a 13000 rpm e o sobrenadante (~ 400 µL) foi transferido para um novo tubo. O mesmo volume de isopropanol foi adicionado e o tubo foi incubado à -20°C por 1 a 2 horas. Em seguida, a preparação foi centrifugada por 20 minutos a 13000 rpm e o sobrenadante descartado. O pellet foi então lavado com 800 µL de etanol 70%. Após descarte do etanol, o *pellet* foi seco e posteriormente hidratado com água Milli-Q e armazenado à -20°C.



	Isolado	Hospedeira	Local	Estado	Ano
BIOVAR 1	RS 433	Batata	Santa Juliana	MG	2010
	RS 436	Tomate	Seabra-BA	BA	2011
	RS 450	Batata	Guarapuava	PR	2011
	RS 460	Tomate	Borrazópolis	PR	2011
	RS 501	Tomate	Ubiapina	CE	2012
	RS 517	Tomate	CNPH	DF	2013
	RS518	Tomate	Alexânia	GO	2013
	RS 533	Tomate	Marilândia	ES	2013
	RS 536	Tomate	Taquara	DF	2013
	K60	Tomate	EUA		1954
BIOVAR 2A	RS 12	Batata	Itapetininga	SP	1987
	RS 23	Batata	Ibicoara	BA	1988
	RS 26	Batata	Castro	PR	1988
	RS 429	Batata	Araxá	MG	2010
	RS 461	Batata	Ibicoara	BA	2011
	RS 488	Tomate	Grandes Rios	PR	2012
	RS 498	Batata	Araxá	MG	2012
	RS 506	Berinjela	Ubajara	CE	2012
	RS 534	Tomate	Cristalina	GO	2013
	RS 537	Batata	Itapetininga	SP	2013
BIOVAR 2T	RS 44	Batata	PAD-DF	DF	1989
	RS 59	Batata	Castro	PR	1990
	RS 66	Batata	Ibicoara	BA	1990
	RS 71	Berinjela	Brazlândia	DF	1990
	RS 77	Berinjela	CNPH	DF	1991
	RS 94	Batata	Pirai do Sul	PR	1992
	RS 478	Gerânio	Vargem Grande Paulista	SP	2002
	RS 481	Eucalipto	Alexânia	GO	2009
	RS 482	Eucalipto	Alexânia	GO	2009
RS 546	Tomate	Ipuiuna	MG	2014	
BIOVAR 3	RS 18	Tomate	Manaus	AM	1987
	RS 355	Jiló	Cólmeia	TO	2008
	RS 380	Pimentão	Camocim de são Felix	PE	2008
	RS 388	Pimenta	Rio Branco	AC	2009
	RS 391	Tomate	Rio Branco	AC	2009
	RS 474	Tomate	Dom Pedro	MA	2011
	RS 507	Berinjela	Ubajara	CE	2012
	RS 508	Tomate	Utinga	BA	2013
	GMI1000	Tomate	Guyana Francesa	-	1978
UW363	Tomate	China	-	1980	

**Figura 7.** Distribuição dos isolados brasileiros do complexo de espécies de *Ralstonia* que formaram os *bulks* contrastantes para as biovars 1, 2A, 2T e 3. Os triângulos verdes indicam os locais de coleta dos isolados da biovar 1, quadrados vermelhos da biovar 2A, quadrados azuis da biovar 2T e círculos pretos indicam isolados da biovar 3. Lista da classificação de biovar, hospedeira original, local e ano de isolamento do conjunto de isolados do complexo de espécies de *Ralstonia* utilizado no estabelecimento dos *bulks* contrastantes para as distintas biovars e que foram analisados via *Bulked segregant analysis* (BSA).

## 2.2. Uso do sistema de marcadores RAPD

Para o estabelecimento dos *bulks*, o DNA genômico de dez isolados de cada biovar foi quantificado, utilizando o espectrofotômetro NanoDrop® Lite (NanoDrop Lite Spectrophotometer, The Thermo Scientific, Wilmington-DE, EUA) e diluído até a concentração de 100 ng/μL. Volumes de 100 μL de DNA de cada isolado foram adicionados em um microtubo de 1,5 mL e vortexados brevemente. Os quatro *bulks* de isolados das biovars contrastantes foram avaliados com 340 *primers* RAPD (série Operon OPA-01 até OPZ-20, Operon Technologies, Alameda, Califórnia, EUA). A reação foi composta de 1 μL de DNA genômico (100 ng/μL), 1,25 μL de tampão 10X (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.3), 0,6 μL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,5 μL de dNTPs (2,5 mM cada), 0,2 μL de *Taq* DNA polimerase (5u/μL), 2 μL de *primer*, 6,95 μL de H<sub>2</sub>O Milli-Q com volume total de 12,5 μL. As reações de amplificação foram efetuadas em um termociclador Veriti® Thermal Cycler. O programa utilizado para a amplificação dos fragmentos foi de um ciclo de 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, para desnaturação, 36°C por 1 minuto para anelamento, e 72°C por 2 minutos para extensão, o ciclo final constituiu-se de 68°C por 10 minutos. Os produtos da PCR foram analisados em géis de agarose (1,5%) corados com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta, utilizando-se o marcador 1 Kb Plus DNA Ladder® (Invitrogen) para a análise dos produtos. Após a seleção dos *primers* RAPD que apresentaram padrões de *amplicons* polimórficos, a reação foi repetida, dessa vez, com *bulks* abertos, ou seja, o DNA de cada isolado foi avaliado individualmente para cada *primer* RAPD, visando validar os marcadores obtidos. Para essa avaliação via RAPD, foi usado o mesmo protocolo descrito anteriormente. Os *amplicons* que se mostraram estáveis, isto é, confirmaram o resultado anterior dos *bulks*, foram cortados do gel de agarose usando um bisturi, transferidos para microtubos de 1,5 mL e purificados com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System®. A

purificação foi quantificada em um espectrofotômetro NanoDrop® Lite e preparados para a clonagem.

### 2.3. Clonagem e Sequenciamento

Para a clonagem dos *amplicons* foi usado o protocolo do TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen). A ligação foi feita adicionando a microtubos: 1 µL do vetor TOPO (10 ng) 1 µL de solução salina; 3 µL de água Milli-Q e 1 µL do produto de PCR (≈30 ng), com volume total de 6 µL de ligação. As reações foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente. Após esse período foram adicionados 2 µL da reação de ligação em cada tubo de célula competente *E. coli* (Mach1-T1), incubando-os em gelo por 10 minutos. O choque térmico foi dado retirando os tubos do gelo e colocando em banho-maria a exatamente 42°C por 30 segundos. Imediatamente os tubos foram retirados e acondicionados em gelo por 2 minutos. Foram adicionados 250 µL de meio SOC e as transformações foram incubadas durante 1 hora a 37°C, com agitação dos tubos em mesa agitadora orbital a 200 rpm. Um volume de 100 µL de cada suspensão de bactérias foi distribuído em placas de Petri contendo meio LB + ampicilina (50 µg/mL). As placas foram incubadas em estufa a 37°C *overnight*. A confirmação e seleção das bactérias transformadas foram feitas via PCR com anelamento a 37°C usando os *primers* universais do vetor M13 *Forward* (5'CGC-CAG-GGT-TTT-CCC-AGT-CAC-GAC3') e *Reverse* (5'TCA-CAC-AGG-AAA-CAG-CTA-TGA-C3'). As bactérias apresentando os fragmentos do tamanho esperado tiveram as reações de PCR purificadas para o posterior sequenciamento. Os fragmentos foram sequenciados em um sequenciador ABI PRISM 3100 da Embrapa Hortaliças, utilizando o Kit *ABI Prism BigDye version 3.1* (Applied Biosystems do Brasil) e os iniciadores universais de síntese do vetor M13 (M13 “*reverse*” e “*forward*”).

#### **2.4. Análise de sequências dos *amplicons* RAPD polimórficos e desenho de *primers* SCARs**

Os segmentos sequenciados correspondentes aos *amplicons* RAPDs foram utilizados para o desenho de *primers* SCARs de 15 a 20 pares de bases. Esses *primers* que consistiram da sequência do próprio *primer* RAPD original mais um segmento de bases internas ao *primer* (Paran & Michelmore, 1993). *Primers* do tipo SCAR foram desenhados usando as informações de sequência amplicons RAPD polimórficos. Nessa análise foi também considerada a posição do fragmento RAPD sequenciado no genoma de *R. solanacearum* e o alinhamento das várias biovares. Desta forma, *primers* internos à região de anelamento também foram desenhados quando observados polimorfismos internos entre biovares. Estes *primers* internos foram combinados entre si e também com os SCARS.

#### **2.5. Análise de sequência, identificação de regiões com identidade e localização física dos marcadores RAPD e SCAR polimórficos**

Trinta e quatro (34) genomas de *R. solanacearum* foram extraídos da base de dados do GenBank e as biovares e filotipos correspondentes foram buscados na literatura (**Tabela 7**). Segmentos genômicos correspondentes aos RAPDs clonados e sequenciados foram identificados em um alinhamento com os 34 genomas disponíveis do CER. As sequências resultantes dos *primers* “forward” e “reverse” obtidas via sequenciamento foram montadas para formar um *contig*. Correções foram realizadas visualmente considerando a informação do eletroferograma com o auxílio do programa Geneious R8 (Kearse *et al.*, 2012) e confirmadas quanto sua etiologia pelo BLAST (Madden *et al.*, 1996). A análise de polimorfismos foi feita visualmente nas sequências alinhadas, buscando regiões exclusivas para uma determinada biovar, com potencial para serem usadas como marcador informativo para distinguir as diferentes biovares.

**Tabela 7.** Lista dos isolados do complexo de espécies de *Ralstonia* com genomas completos disponíveis na base de dados do GenBank e EMBL que foram utilizados em análises via subtração *in silico* em busca de regiões exclusivas para as diferentes biovars.

Isolado	Filotipo/ sequevar	Biovar	Hospedeira	Origem	Acesso
<b>FJAT-1458-avir</b>	1	-	Tomate Assintomático	China	GenBank: AHIX00000000.1
<b>FJAT-91</b>	1	3	Tomate	China	GenBank: AHY000000000
<b>FQY_4</b>	I	3	Solo	China	GenBank: CP004012, CP004013
<b>Rs-09-161</b>	I	3	Berinjela	Índia	GenBank: NZ_CM002757.1, NZ_CM002758.1
<b>Rs-10-244</b>	I	3	Pimenta	Índia	GenBank: NZ_CM002755.1, NZ_CM002756.1
<b>Y45</b>	I	3	Fumo	China	GenBank: AFWL000000000
<b>SD54</b>	I-16	4	Gengibre	China	GenBank: ASQR00000000.2
<b>GMI1000</b>	I-18	3	Tomate	Guiana Francesa	GenBank: NC_003295, NC_003296
<b>NCPFB282</b>	II-2	2	Batata	Colômbia	GenBank: JQSH00000000.1
<b>23-10BR</b>	II-27	2	Batata	Brasil	GenBank: JQOI00000000.1
<b>P673</b>	II-4	1	<i>Epipremnum aureum</i>	Estados Unidos	GenBank: JALO01000000
<b>B50</b>	IIA-24	1	Banana	Brasil	EMBL: PRJEB7421
<b>IBSBF1900</b>	IIA-24	1	Banana	Brasil	EMBL: PRJEB8309
<b>CFBP2957</b>	IIA-36	1	Tomate	Antilhas Francesas	EMBL: FP885897, FP885907
<b>Grenada 9-1</b>	IIA-6	1	Banana	Granada	EMBL: PRJEB7428
<b>UW181</b>	IIA-6	1	Banana da Terra	Venezuela	EMBL: PRJEB8309
<b>K60T</b>	IIA-7	1	Tomate	Estados Unidos	EMBL: CAGT01000001
<b>CFIA906</b>	IIB	2	-	-	GenBank: JNVP00000000.3
<b>CFBP3858</b>	IIB-1	2	Batata	Holanda	EMBL: PRJEB8309
<b>IPO1609</b>	IIB-1	2	Batata	Holanda	GenBank: CU914168, CU914166
<b>NCPFB909</b>	IIB-1	2	-	Egito	GenBank: JNGD00000000.1
<b>POPS2</b>	IIB-1	2	-	China	GenBank: JQSI00000000.1
<b>RS2</b>	IIB-1	2	Batata	Bolívia	EMBL: PRJEB8309
<b>UY031</b>	IIB-1	2	Batata	Uruguai	GenBank: NZ_CP012687.1, NZ_CP012688.1
<b>CFBP1416</b>	IIB-3	1	Banana da Terra	Costa Rica	EMBL: PRJEB7434
<b>CIP417</b>	IIB-3	1	Banana	Filipinas	EMBL: PRJEB7427
<b>MolK2</b>	IIB-3	1	Banana	Filipinas	GenBank: CAHW01000040

<b>CFBP6783</b>	IIB-4	1	Helicônia	Antilhas Francesas	EMBL: PRJEB7432
<b>IBSBF1503</b>	IIB-4	1	Pepino	Brasil	EMBL: PRJEB7433
<b>Po82</b>	IIB-4	1	Batata	México	GenBank: CP002819, CP002820
<b>UW163</b>	IIB-4	1	Banana da Terra	Peru	EMBL: PRJEB7430
<b>CFBP7014</b>	IIB-59	1	Antúrio	Trinidad	EMBL: PRJEB8309
<b>CMR15</b>	III	1	Tomate	Camarões	EMBL: FP885895, FP885896
<b>PSI07</b>	IV	2	Tomate	Indonésia	EMBL: FP885906, FP885891

“-” sem informação.

## 2.6. Desenvolvimento de *primers* específicos para o gene codificador da sorbitol desidrogenase (um dos genes candidatos em associação com o perfil de biovares)

Primers foram gerados via subtração *in silico* dos genomas alinhados das diversas biovares disponíveis no GenBank e em outras bases de dados. Para a síntese do par de *primers* Sorb-B3, foram usadas as sequências do gene codificador da sorbitol desidrogenase dos genomas de *R. pseudosolanacearum* (biovar 3) disponíveis (**Tabela 7**). As diferentes sequências obtidas foram alinhadas e os *primers* foram desenhados pelo *plugin* Primer3 (Untergasser *et al.*, 2012) e pelo programa PrimerSelect (Lasergene, Madison, WI). Na síntese dos *primers*, foram levadas em consideração as regiões comuns (conservadas) nas diferentes variantes do gene codificador da sorbitol desidrogenase bem como os critérios de conteúdo de GC, tamanho, compatibilidade entre pares de *primers* e ausência de auto-anelamento.

## 2.7. Avaliação dos *primers* em gradientes de temperaturas de anelamento

Os *primers* sintetizados foram testados em gradiente com as temperaturas de 60°C, 62°C, 64°C, 66°C, 68°C e 70°C. O programa de amplificação consistiu de um ciclo de 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, para desnaturação, gradiente (60°C - 70°C) por 30 segundos para anelamento, e 72°C por 45 segundos para extensão, com extensão final de 72°C por 6 minutos.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Estabelecimento dos *Bulks* de isolados contrastantes para cada biovar

Não participaram dos *bulks* isolados das biovars 4 e 5 (raças 4 e 5), uma vez que ainda não foram reportados no Brasil. A ausência de uma distribuição geográfica ampla de isolados de biovar 2A e 3, não permitiu uma diversificação muito grande durante a formação dos *bulks*, em especial dos isolados de biovar 2A, que ocorrem em locais de clima mais ameno e majoritariamente em batata.

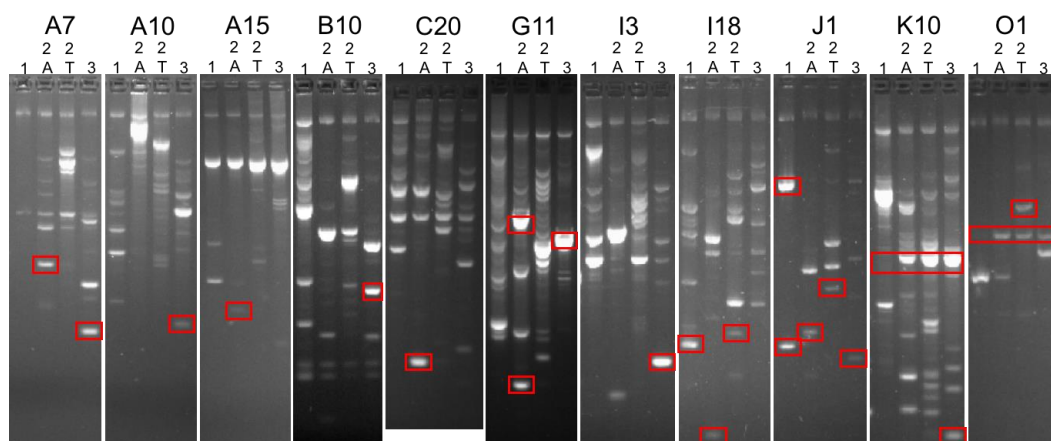
#### 3.2. Uso do sistema de marcadores RAPD

Foram identificados 11 *primers* que geraram padrões de fragmentos polimórficos entre isolados das quatro biovars (**Tabela 8**). Esses *primers* foram empregados em estudos posteriores buscando o desenvolvimento de *primers* específicos (**Figura 8**). Os *primers* OP-I18, OP-J1, OP-O1, OP-K10 se mostraram polimórficos para a **biovar 1**; os *primers* OP-A7, OP-A15, OP-C20, OP-I18 e OP-J1 mostraram *amplicons* exclusivos para isolados da **biovar 2A**; *primers* OP-I18, OP-J1 e OP-O1 para isolados da **biovar 2T**; e os *primers* OP-A7, OP-A10, OP-B10, OP-G11, OP-I3, OP-J1 e OP-K10 para isolados da **biovar 3**. Os *amplicons* apresentaram tamanhos variados e foram selecionados aqueles em um intervalo até 1700 pb.

**Tabela 8.** Lista das biovars e os respectivos *primers* RAPD com polimorfismos entre as biovars do complexo de espécies de *Ralstonia*.

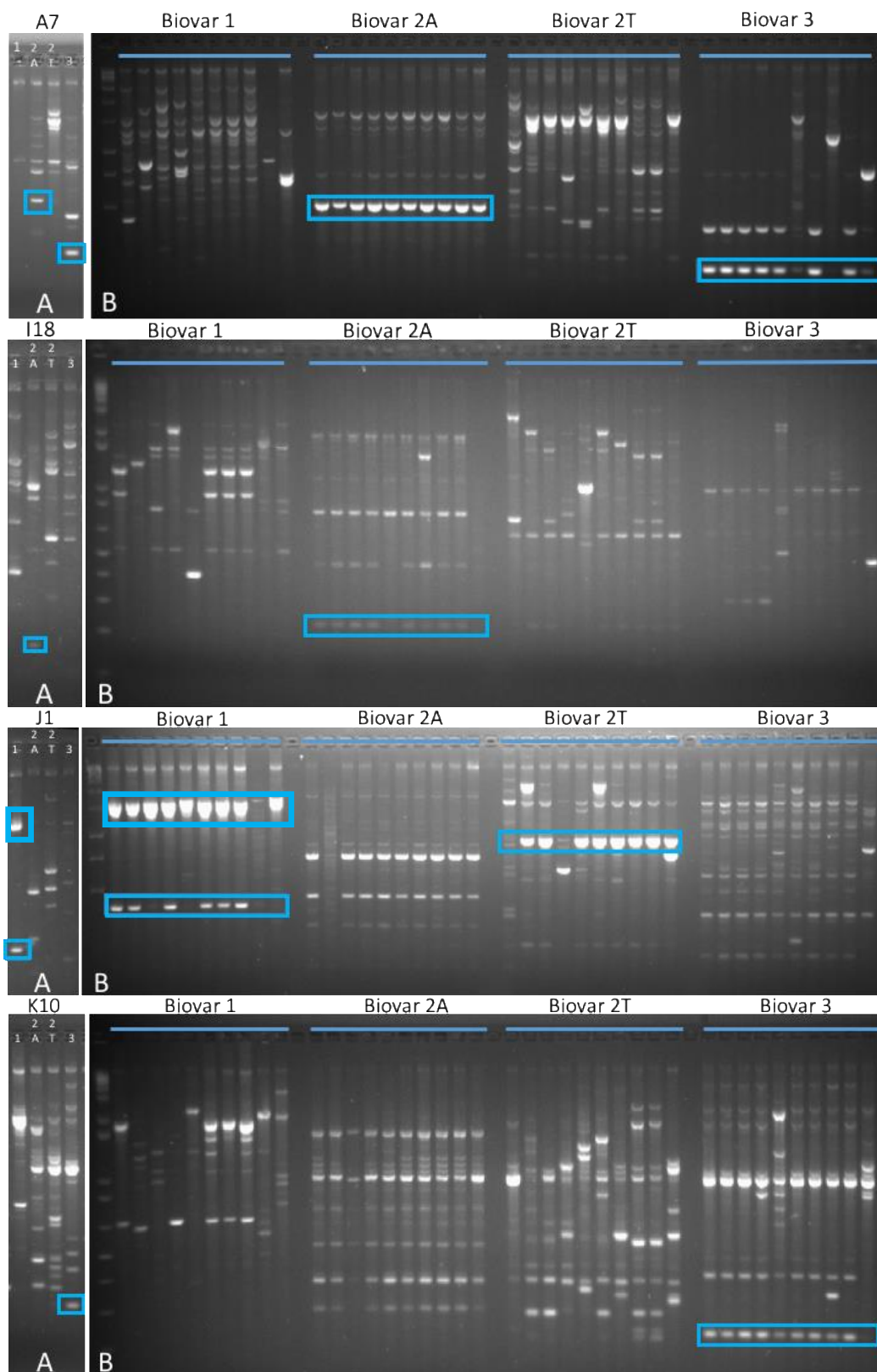
Biovar 1	Biovar 2A	Biovar 2T	Biovar 3
OP-I18	OP-A7	OP-I18	OP-A7
OP-J1	OP-A15	OP-J1	OP-A10
OP-O1	OP-C20	OP-O1	OP-B10
OP-K10	OP-I18		OP-G11
	OP-J1		OP-I3
			OP-J1
			OP-K10





**Figura 8.** Painel de géis de agarose mostrando o perfil de *amplicons* resultantes de ensaios de PCR com um conjunto de *primers* RAPD (*Operon*). Os códigos dos *primers* empregados estão identificados na parte superior, seguido da biovar do *bulk* de isolados do complexo de espécies de *Ralstonia*. Em vermelho estão destacados os *amplicons* polimórficos.

Para validação dos polimorfismos, o DNA dos isolados foi amplificado individualmente com os mesmos *primers* (**Figura 9**). Esta análise reduziu o total de *primers* com polimorfismos estáveis para quatro. Para a biovar 1 foram validados os *primers* OP-J1 e OP-I18; biovar 2A, OP-I18, OP-A7; biovar 2T, J1; biovar 3, OP-A7 e OP-K10 (**Tabela 9**).



**Figura 9.** Géis de agarose após eletroforese das reações de PCR dos 10 DNAs dos isolados do complexo de espécies de *Ralstonia* que compuseram os quatro *bulks* das biovars 1, 2A, 2T e 3 com os *primers* RAPD OP-A7, OP-i18, OP-J1 e OP-K10. A – Segmento do gel de eletroforese

da PCR com os *bulks* com quadrados em azul representando os *amplicons* exclusivos amplificados. B – Gel de eletroforese da PCR para validação do *amplicon* verificado no anterior.

**Tabela 9.** *Primers* RAPD utilizados por biovar estudada de isolados do complexo de espécies de *Ralstonia* com seus respectivos *amplicons*.

<b>Biovar/Primer</b>	<b>Tamanho <i>amplicon</i> em pares de base (pb)</b>
<b>Biovar 1</b>	
OP-J1	1700
OP-J1	410
<b>Biovar 2A</b>	
OP-A7	492
OP-i18	186
<b>Biovar 2T</b>	
OP-J1	938
<b>Biovar 3</b>	
OP-A7	232
OP-K10	253

### 3.3. Clonagem e sequenciamento

Após a validação dos marcadores com *bulks* abertos, um *amplicon* de cada região de interesse foi removido do gel, purificado, clonado e sequenciado. Seis fragmentos foram sequenciados e identificados pelo *primer* usado seguido da biovar, sendo então as sequências: J1-B1-B com 410 pb, J1-B1-A com 1700 pb, A7-B2A com 492, i18-B2A com 186, J1-B2T com 938, A7-B3 com 232, K10-B3 com 253.

### 3.4. Desenho de *primers*

Após montagem e correção manual das sequências foram buscadas regiões homólogas nos genomas do CER (**Tabela 10**). Dessas regiões foram desenhados um total de 25 *primers* (**Tabela 11**) para serem avaliados.

**Tabela 10.** Lista dos pares de *primers* desenhados e dos amplicons sequenciados para marcadores gerados para cada biovar do complexo de espécies de *Ralstonia*, com suas respectivas características como: genoma com maior identidade com o amplicon sequenciado via análise com BLAST, anotação da região homóloga ao amplicon, porcentagem de identidade com a região homóloga, região dos *amplicons* correspondendo ao intervalo da sequência em que os *primers* anelam, e tamanho do *amplicon*. Tamanho *amplicon* SCARs se refere ao tamanho do fragmento gerado pelos *primers* SCARs, ou seja, desenhados como uma extensão do *primer* RAPD. O tamanho *amplicon primers* se refere ao fragmento gerado pelos *primers* desenhados internamente ao segmento sequenciado.

<i>Primer</i>	Genoma c/ homologia	Gene	%identidade	Região dos Primers SCARs	Região dos Primers	Tamanho <i>amplicon</i> SCARs (pb)	Tamanho <i>amplicon primers</i> (pb)
J1-B1-A	FP885897	Isocitrate dehydrogenase (NADP(+)) / Região Intergênica /	98,4	-	207-1685	-	1478
J1-B1-B	FP885897	alpha,beta hydrolase CDS / Região Intergênica	99,0	1-408	30-302	408	273
A7-B2A	CP012688	3',5'-cyclic adenosine monophosphate	99,4	1-492	75-299	492	225
I18-B2A	CP012687	hypothetical protein - Conserved membrane protein	99,5	1-186	33-106	186	74
J1-B2T	FP885906	Região Intergênica / putative type III effector protein	90,8	1-938	-	938	-
A7-B3	AL646052	putative transposase-related protein CDS / Região intergênica	99,6	1-232	14-192	232	179
K10-B3	AL646053	probable remnant of a transposase gene protein CDS /	98,7	1-253	1-97	253	97

“-” sem informação.

**Tabela 11.** Lista de *primers* desenhados a partir dos sequenciamentos de fragmentos RAPD amplificados usando DNA genômico de isolados do complexo de espécies de *Ralstonia* de diferentes biovares. Os *primers* SCAR são listados com o prefixo “SCAR”, os demais foram desenhados internamente baseados em polimorfismos visualizados na subtração *in silico*.

Nome	Sequências (5'-3')	Tamanho
A7-B2A-F	ACGTTCAAAATCCTGGTCGT	225 pb
A7-B2A-R	GAGTCCTATGAACTGGCCCG	
A7-B3-F	GAGGAGCGCGACATCCTAAA	179 pb
A7-B3-R	CAGAGGGAAGGTCAGGCTTG	
i18-B2A-F	CGTGTCGATTGCGGTATTCG	74 pb
i18-B2A-R	CGAGCACGATTACAGTGGCT	
J1-B1-B-F	TGCAAGGTGGCCATTCTCAT	274 pb
J1-B1-B-R	TGGGACGTTCTCGGAAATCG	
J1-B1-A-F	CCCGGAGTAACCTTGAAGAA	1750 pb
J1-B1-A-R	CCCCGATAACCCCATCA	
K10-B3-R	TTCTGGCTGCGGATTCAACT	94 pb
Sorb-B3-1-F	CGACCAGACGCTTCTTCTCA	541 pb
Sorb-B3-3-R	CTCGTCGATTTGAAACCCGC	
SCAR-A7-B2A-F	GAAACGGGTGATGGTGCATG	491 pb
SCAR-A7-B2A-R	GAAACGGGTGTGAACAGAAA	
SCAR-A7-B3-F	GAAACGGGTGACCGAGGAGC	232 pb
SCAR-A7-B3-R	GAAACGGGTGCATAACCCAG	
SCAR-i18-B2A-F	TGCCCAGCCTTGGCAATGGC	186 pb
SCAR-i18-B2A-R	TGCCCAGCCTGAAATTAGCT	
SCAR-J1-B1-B-F	CCCGGCATAAAGAAACCGTA	408 pb
SCAR-J1-B1-B-R	CCCGGCATAAGCATTCTTGG	
SCAR-J1-B2T-F	CCCGGCGTAATCTAAATGTG	936 pb
SCAR-J1-B2T-R	CAGGCAAACAGTCAATCAA	
SCAR-K10-B3-F	GTGCAACGTGGCAGTCTTAC	254 pb
SCAR-K10-B3-R	GTGCAACGTGCGGGAGGTGG	

### 3.5. Análise das sequências dos *amplicons* polimórficos entre isolados contrastantes para as diferentes biovares

A sequência J1-B1-A apresentou maior número de genomas (24) com homologia, identificados tanto com isolados biovar 1 como 2 e 3, com identidade variando entre 93,63% e 98,4%. A região foi fisicamente localizada dentro do DNA cromossomal, sendo identificada parcialmente como uma cópia do gene codificador de uma isocitrato desidrogenase. Esse gene

codifica uma enzima associada com uma das principais rotas metabólicas de produção de energia, reduzindo NADPH para NADP<sup>+</sup> (Garnak & Reeves, 1979; Clark *et al.*, 2016).

A sequência produzida com os pares de *primers* J1-B1-B apresentou homologia com o DNA cromossomal de um isolado, CFBP2957 da biovar 1 com 99% de identidade, essa região cobre parcialmente o gene codificador da alpha/beta hidrolase. Este grupo de enzimas está estruturalmente relacionado com diversas funções catalíticas e cópias destes genes são encontradas em todos os genomas conhecidos (Lenfant *et al.*, 2013). Alguns dos membros dessa família são acetilcolinesterase, dielactona hidrolase, lipase, tioesterase, carboxipeptidase tipo serina, prolina aminopeptidase, prolil oligopeptidase, haloalcano dehalogenase, haloperoxidase, epóxido hidrolase e hidroxinitrila liase entre outros (Holmquist, 2000).

A sequência obtida do *amplicon* A7-B2A apresentou homologia com regiões do DNA cromossomal e do megaplasmídeo de 19 isolados, de diferentes biovars, com identidade oscilando entre 77,3% e 99,39% , tendo alta identidade com isolados biovar 2A. A sequência obtida do *amplicon* A7-B2A foi anotada como sequência parcial de uma fosfohidrolase.

A sequência i18-B2A apresentou homologia com DNA cromossomal de 27 isolados de diferentes biovars, com identidade variando entre 63,4% e 98,4%. A região contém um segmento parcial de um gene codificador de uma proteína componente de membrana.

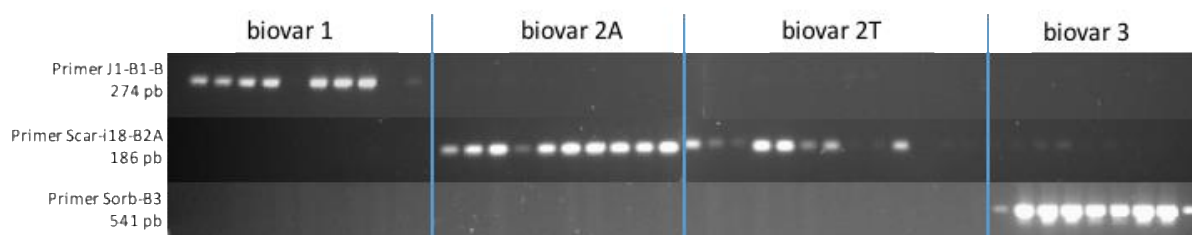
A sequência J1-B2T apresentou homologia com DNA cromossomal de oito isolados de diferentes biovars, com identidade variando entre 85,99% e 97,22%. A sequência J1-B2T foi identificada como contendo o segmento de um gene codificador de uma proteína da classe serina-treonina quinase que foi previamente identificada como uma proteína efetora do tipo III (Remenant *et al.*, 2010).

A sequência A7-B3 somente teve homologia com o DNA cromossomal do isolado tipo GMI1000 com 99,14% de identidade e anotada como o segmento parcial de um gene codificador de uma transposase (Reznikoff, 2008).

A sequência derivada do marcador K10-B3 teve homologia com o DNA cromossomal e do megaplasmídeo de 13 isolados, com identidade variando entre 37,39% e 98,64%, porém em regiões do genoma sem prévias e/ou detalhadas anotações.

### **3.6. Avaliação do conjunto de *primers* obtidos entre isolados contrastantes para as diferentes biovars**

O desenho dos *primers* seguiu o descrito no tópico 2.4. Os pares de *primers* J1-B1-B, SCAR-i18-B2A, SCAR-A7-B3, A7-B3, SCAR-K10-B3, K10-B3 e Sorb-B3 apresentaram amplicons específicos e de presença consistente entre os dez isolados selecionados de cada biovar. O par J1-B1-B amplificou de forma específica em sete dos dez isolados da biovar 1 (**Figura 10**); o par SCAR-i18-B2A amplificou isolados da biovar 2A e também amplificou isolados da biovar 2T e com fragmentos de amplificação tênues foram observados em isolados da biovar 3. O par de *primers* Sorb-B3 amplificou somente isolados da biovar 3 com *amplicon* de tamanho aproximado de 541 pb. Os demais *primers* apresentaram-se inespecíficos nas condições testadas. As concentrações dos reagentes da PCR e programa do termociclador estão descritas na **Tabela 12**.



**Figura 10.** Painel de géis de eletroforese em gel de agarose com os produtos de PCR de dez isolados de cada biovar do complexo de espécies de *Ralstonia* com os pares de *primers* J1-B1-B, SCAR-i18-B2A e Sorb-B3, ilustrando os níveis de especificidade de cada par.

**Tabela 12.** Condições utilizadas para a PCR e programa do termociclador para uso com os pares de *primers* J1-B1-B, SCAR-i18-B2A e Sorb-B3.

Reagentes PCR	( $\mu$ L)	Ciclos	Processo	Temp °C	Tempo
Água	6.1	1X	Desnaturação inicial	94	4 min
Tampão <i>Taq</i>	1		Desnaturação	95	30 seg
MgCl <sub>2</sub>	0.2	30X	Anelamento	64	30 seg
dNTPs	0.5		Extensão	75	30 seg
<i>Primer 1</i>	0.5	1X	Extensão Final	75	6 min
<i>Primer 2</i>	0.5	4X	Resfriamento	4	$\infty$
<i>Taq</i> polimerase	0.2				
DNA	1				
<b>TOTAL</b>	<b>10</b>				

#### 4. DISCUSSÃO

Embora de execução laboratorial demorada, onerosa e trabalhosa, o sistema de classificação de biovars tem se mostrado muito informativo no ponto de vista prático, revelando associações com características peculiares dos diferentes isolados, tais como padrões de proteínas de membrana, nichos ecológicos, gama de plantas hospedeiras e distribuição geográfica (Dristig & Dianese, 1990; Prior *et al.*, 1990; Hayward, 1994b; Lopes *et al.*, 1994; Netto *et al.*, 2003). Isolados da raça 1/biovar 3 (*R. pseudosolanacearum*) têm se mostrado mais virulentos em espécies do gênero *Capsicum* (Lopes & Boiteux, 2004), ao passo que isolados de raça 1/biovar 1 apresentam maior especificidade pelo tomateiro (Takatsu & Lopes, 1997). Os isolados da raça 3/biovar 2A estão associados com a capacidade de causar murcha em



temperaturas mais amenas quando comparados com isolados da biovar 2T (Lopes, 2005). Além disso, recentes resultados (Lopes *et al.*, 2015) indicam que o cafeeiro (*C. arabica*) é afetado apenas por isolados da biovar 3 (*R. pseudosolanacearum*). A classificação de biovars pode ser ainda mais informativa quando acoplada com a determinação das raças (*sensu* Buddenhagen *et al.*, 1962), como no caso da raça 3/biovar 2, que afeta solanáceas e gerânios (Williamson *et al.*, 2002) e de isolados da raça 4/biovar 3, que ocorrem em gengibre (Kumar *et al.*, 2014).

Nesse cenário, a disponibilidade de um sistema de marcadores moleculares baseados em DNA para determinação de biovars traria inúmeras vantagens relacionadas a custo, facilidade e escala de execução. Mesmo com a ampla aplicação prática demonstrada pelo sistema de biovars e o crescente número de genomas completos de *R. solanacearum* sequenciados, ainda não estão disponíveis e/ou validados métodos de detecção molecular de biovars derivados de informações e/ou anotações genômicas associadas diretamente com esse perfil bioquímico.

Visando estabelecer um robusto sistema de marcadores moleculares para identificação de biovars de *R. solanacearum*, uma coleção de 340 *primers* RAPD foi avaliada com DNA extraído de isolados pertencentes aos quatro biovars que ocorrem no Brasil (1, 2A, 2T e 3). Neste trabalho, foi possível encontrar um subconjunto de 3,23% de *primers* capazes de gerar *amplicons* polimórficos e exclusivos para as biovars 1, 2A, 2T e 3. Esses níveis de polimorfismo foram relativamente baixos, mas estão potencialmente subestimados, uma vez que foram selecionados ou incluídos no presente estudo apenas fragmentos com intervalos arbitrários para os tamanhos mínimos e máximos dos *amplicons* (100 a 1000 bp).

A técnica de BSA acoplada com o sistema RAPD demonstrou ser uma técnica útil na identificação de polimorfismos e validação de marcadores para biovar. A eficiência da estratégia de BSA observada no presente estudo está em acordo com os estudos de identificação de genes associados a distintos “*mating types*” em *Pleurotus ostreatus* (Larraya *et al.*, 2001) e

de estudos de genes relacionados ao uso de xilose em *Saccharomyces cerevisiae* (Wenger *et al.*, 2010).

A disponibilidade de genomas de referência completos permitiu refinar o desenho de *primers* SCARs adicionando *primers* internos quando polimorfismos foram observados dentro de um *amplicon* polimórfico. O uso da estratégia de desenho de *primers in silico* e da subtração *in silico* para biovares e raças prevalentes no Brasil é dificultado pela inexistência de genomas completos disponíveis (especialmente de isolados obtidos no território brasileiro).

O desenho de *primers* combinando a informação de sequência dos *amplicons* mais a subtração *in silico* permitiu o desenho de dois pares de *primers* específicos, apesar da presença de algumas bandas inespecíficas tênues (SCAR-i18-B2 e J1-B1-B) e de um par de *primers* altamente específico (Sorb-B3). Este último contou também com o fato de se tratar de um gene alvo específico da biovar 3. Desta forma, a subtração *in silico* mesmo diante das limitações encontradas (reduzido número de genomas disponíveis com biovar caracterizada), demonstrou ser uma alternativa viável para o desenho de *primers* de forma mais precisa, reduzindo possibilidade de erros, portanto, também os custos.

A sequência que apresentou o nível mais elevado de identidade com o fragmento obtido com os *primers* J1-B1-B (J1-B1-B-F e J1-B1-B-R) foi identificada englobando um potencial gene codificador de uma alpha/beta hidrolase. No caso do par de *primers* SCAR-i18-B2A (SCAR-i18-B2A-F e SCAR-i18-B2A-R), não foi possível verificar *in silico* o anelamento da região sequenciada com isolados de biovar 2T, devido à ausência de genomas identificados/caracterizados como sendo dessa biovar. De fato, uma fração considerável dos genomas sequenciados está sem uma caracterização apropriada, em especial para raça e biovar, dificultando a análise e interpretação dos resultados obtidos no presente trabalho. Ao contrário dos filotipos e das sequevares, a determinação de biovar necessita da conservação de isolados

viáveis para a condução dos testes (Hayward, 1994a), o que pode dificultar a confirmação da potencial universalidade dos *primers* identificados no presente trabalho.

A especificidade para isolados da biovar 3 foi confirmada para o par de *primers* Sorb-B3. Para o único isolado com resultados contraditórios (ausência de amplicons específicos) foi posteriormente confirmado que o comportamento anômalo foi ocasionado por problemas de baixa qualidade do DNA genômico usado como molde nas reações iniciais de PCR. No entanto, é importante salientar que o par de *primers* Sorb-B3 não pode ser considerado como exclusivo da biovar 3, uma vez que o gene codificador da sorbitol desidrogenase (*polS*) está também presente em isolados de biovar 4 (Kanjanasopa *et al.*, 2006). No entanto, para o conjunto de isolados brasileiros empregados no presente trabalho, o par de *primers* Sorb-B3 mostrou uma elevada especificidade.

A região de 22 kb descrita por Gabriel *et al.* (2006) como exclusiva da biovar 3 e provavelmente da biovar 4, mostrou elevado potencial de uso para o encontro de genes exclusivos, como o gene da sorbitol desidrogenase. Outros genes nessa região serão buscados futuramente visando a criação de mais marcadores associados com a biovar 3 e 4.

A análise de sequência das regiões genômicas caracterizadas no presente trabalho indicaram polimorfismos em genes que não estão, aparentemente, relacionados de maneira direta com patogênese de patógenos do CER. A marcante exceção foi o segmento genômico obtido após sequenciamento do *amplicon* gerado pelo par de *primers* J1-B2T, que se trata de uma potencial proteína efetora. No entanto, a diversidade genética dessa região não permitiu distinguir as diferentes biovars, utilizando marcadores do tipo SCAR convencionais ou mesmo *primers* internos desenhados na região do SCAR.

A região A7-B3, apesar de polimórfica, é parcialmente composta por uma transposase, o que pode dificultar o seu uso como marcador por se tratar de uma região que pode ter várias

cópias no genoma (Guidot *et al.*, 2009). Em busca da identificação da família a qual esse elemento móvel pertence, não foi possível encontrar outro componente de *transposon* devidamente caracterizado por meio do BLAST. A sequência não foi somente encontrada em sequências brasileiras de isolados de filotipo I, como também nos genomas de referência GMI1000, FQY\_4, YC45 e mais outros três genomas de filotipo III, podendo se tratar de uma região de relativamente baixa instabilidade genética.

Trabalhos adicionais visando a busca por *primers* específicos para isolados da biovar 2T serão necessários. Essa variante é nativa do Brasil e se encontra atualmente disseminada em outras regiões fora da América do Sul (Nouri *et al.*, 2009). Já foi observado que essa biovar apresenta outras características fenotípicas distintas da biovar 2A, causando doença em locais com temperaturas mais altas e apresentando uma gama de plantas hospedeiras mais ampla (Lopes, 2005).

O uso de *primers* específicos para cada biovar seria mais prático que o teste comum de meio de cultura de Hayward (1964). O tempo de 14 dias (considerado o período ideal para a avaliação das diferentes biovars em meio de cultura) impede uma análise rápida, precisa e em larga escala. A quantidade de reagentes empregada para a confecção do meio também é outro obstáculo, o custo dos reagentes e aplicação de seis fontes de carbono mais os componentes para o meio básico pode ser uma limitação, em especial se considerar que reagentes de PCR e termocicladores podem ser encontrados em praticamente qualquer laboratório e que seu custo continua em queda (Harris, 1998). A velocidade e praticidade da PCR não foram as únicas vantagens. Problemas de leitura do teste de meio de cultura (quando os diferentes carboidratos não alteram completamente sua cor para o amarelo) são comumente observados e representa outro importante inconveniente do método clássico de determinação de biovars. Nesse cenário, o emprego de um sistema de marcadores robusto para a identificação das diferentes biovars

representa uma importante contribuição de ordem prática especialmente em estudos envolvendo um grande número de isolados.

## 5. CONCLUSÕES

- A estratégia de *Bulked segregant analysis* permitiu a identificação de marcadores polimórficos em isolados de diferentes biovars, mas apresentou baixos índices de efetividade de 3,21% (número de polimorfismo em bulk/número de polimorfismos validados);
- A técnica de sequenciamento de regiões polimórficas reveladas pelo sistema RAPD em combinação com a localização física das sequências via análise de genomas *in silico* permitiu a identificação de um conjunto de sete pares de *primers* informativos (J1-B1-B, SCAR-i18-B2A, SCAR-A7-B3, A7-B3, SCAR-K10-B3, K10-B3 e o *primer* no gene candidato Sorb-B3) para identificação de biovars;
- Os pares de *primers* J1-B1-B, SCAR-i18-B2A e Sorb-B3 apresentaram potencial utilidade para o estabelecimento de sistemas rápidos de identificação/distinção molecular de isolados das biovars 1, 2 e 3;
- *Primers* capazes de gerar polimorfismos exclusivos para isolados da biovar 2T não foram identificados, demandando trabalhos adicionais de busca de marcadores.

## 6. PERSPECTIVAS

- Buscar novos fragmentos polimórficos com potencial para desenho de novos *primers*;
- Continuar o levantamento de características de isolados com genomas completos sequenciados;
- Desenvolver marcadores específicos para as biovars 1, 2A e 2T.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BUDDENHAGEN, I.W.; SEQUEIRA, L. & KELMAN, A. 1962. Designation of races of *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 52:726-730.
- CLARK, O.; YEN, K. & MELLINGHOFF, I.K. 2016. Molecular Pathways: Isocitrate Dehydrogenase Mutations in Cancer. *Clinical Cancer Research* 22:1837-1842.
- DRISTIG, M.C.G. & DIANESE, J.C. 1990. Characterization of *Pseudomonas solanacearum* biovars based on membrane protein patterns. *Phytopathology* 80:641-658.
- FEGAN, M.; HOLOWAY, G.; HAYWARD, A.C. & TIMMIS, J. 1998. Development of a diagnostic test based on the polymerase chain reaction (PCR) to identify strains of *Ralstonia solanacearum* exhibiting the biovar 2 genotype. In: PRIOR, P.; ALLEN, C. & ELPHINSTONE, J. eds. *Bacterial Wilt disease. Molecular and ecological aspects*. 1 ed. Springer. Alemanha. p. 34-43.
- FEGAN, M. & PRIOR, P. 2005. 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*. 1 ed. APS Press. Estados Unidos. p. 449-461.
- GABRIEL, D.W.; ALLEN, C.; SCHELL, M.; DENNY, T.P.; GREENBERG, J.T.; DUAN, Y.P.; FLORES-CRUZ, Z.; HUANG, Q.; CLIFFORD, J.M. & PRESTING, G. 2006. Identification of open reading frames unique to a select agent: *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19:69-79.
- GARNAK, M. & REEVES, H.C. 1979. Phosphorylation of isocitrate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Science* 203:1111-1112.
- GUIDOT, A.; ELBAZ, M.; CARRÈRE, S.; SIRI, M.I.; PIANZZOLA, M.J.; PRIOR, P. & BOUCHER, C. 2009. Specific genes from the potato brown rot strains of *Ralstonia solanacearum* and their potential use for strain detection. *Phytopathology* 99:1105-1112.
- GUND, S.V.; MOGER, N.; KRISHNARAJ, P.U.; BHAT, R. & KAMANNA, B.C. 2011. Development of race specific SCAR marker for the detection of *Ralstonia solanacearum* (race 2). *Journal of Applied Bioscience* 37:91-96.
- GUND, S.V.; NARAYAN, M.; KRISHNARAJ, P.U.; RAMESH, B. & KAMANNA, B.C. 2013. Molecular Diagnostic Tool for Specific Identification of *Ralstonia solanacearum* through SCAR Marker. *Indian Journal of Plant Protection* 41:342-348.
- HARRIS, E. 1998. A low-cost approach to PCR: appropriate transfer of biomolecular techniques. 1 Ed. Oxford University Press. Reino Unido.
- HAYWARD, A. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology* 27:265-277.

- HAYWARD, A.C. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annual Review of Phytopathology 29:65-87.
- HAYWARD, A.C. 1994a. The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. In: HAYWARD, A.C. & HARTMAN, G.L. eds. *Pseudomonas solanacearum: The disease and its causative agent*. 1 ed. CABI International. Reino Unido. p. 101-115.
- HAYWARD, A.C. 1994b. Systematics and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. In: HAYWARD, A.C. & HARTMAN, G.L. eds. *Bacterial Wilt: the Disease and its Causative Agent, Pseudomonas solanacearum*. 1 ed. CAB International. Estados Unidos. p. 123-135.
- HE, L.Y.; SEQUEIRA, L. & KELMAN, A. 1983. Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from China. Plant Disease 67:1357-1361.
- HOLMQUIST, M. 2000. Alpha beta-hydrolase fold enzymes structures, functions and mechanisms. Current Protein and Peptide Science 1:209-235.
- HORITA, M. & TSUCHIYA, K. 2001. Genetic diversity of Japanese strains of *Ralstonia solanacearum*. Phytopathology 91:399-407.
- HORITA, M.; TSUCHIYA, K.; SUGA, Y.; YANO, K.; WAKI, T.; KUROSE, D. & FURUYA, N. 2014. Current classification of *Ralstonia solanacearum* and genetic diversity of the strains in Japan. Journal of General Plant Pathology 80:455-465.
- HUET, G. 2014. Breeding for resistances to *Ralstonia solanacearum*. Frontiers in Plant Science 5:715.
- JAUNET, T.X. & WANG, J.-F. 1999. Variation in genotype and aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* race 1 isolated from tomato in Taiwan. Phytopathology 89:320-327.
- KANJANASOPA, D.; CHATCHAWANKANPHANICH, O.; CHOWPONGPANG, S.; KOSITRATANA, W. & THAVEECHAI, N. 2006. Characterization of the Sugar Utilization Gene *polS* from *Ralstonia solanacearum*. Kasetsart Journal Natural Science 40:10.
- KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; BUXTON, S.; COOPER, A.; MARKOWITZ, S. & DURAN, C. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. Bioinformatics 28:1647-1649.
- KELMAN, A. 1954. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. Phytopathology 44:693-695.
- KUMAR, A.; PRAMEELA, T.P.; SUSEELABHAI, R.; SILJO, A.; ANANDARAJ, M. & VINATZER, B.A. 2014. Host specificity and genetic diversity of race 4 strains of *Ralstonia solanacearum*. Plant Pathology 63:1138-1148.

- LARRAYA, L.M.; PÉREZ, G.; IRIBARREN, I.; BLANCO, J.A.; ALFONSO, M.; PISABARRO, A.G. & RAMÍREZ, L.A. 2001. Relationship between monokaryotic growth rate and mating type in the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology* 67:3385-3390.
- LEE, Y.-A. & WANG, C.-C. 2000. The design of specific primers for the detection of *Ralstonia solanacearum* in soil samples by polymerase chain reaction. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 41:121-128.
- LENFANT, N.; HOTELIER, T.; BOURNE, Y.; MARCHOT, P. & CHATONNET, A. 2013. Proteins with an alpha/beta hydrolase fold: relationships between subfamilies in an ever-growing superfamily. *Chemico-Biological Interactions* 203:266-268.
- LIM, S.H.; KIM, J.G. & KANG, H.W. 2009. Novel SCAR primers for specific and sensitive detection of *Agrobacterium vitis* strains. *Microbiological Research* 164:451-460.
- LOPES, C.A. 2005. Murchadeira da batata. 1 Ed. Associação Brasileira da Batata. Itapetininga.
- LOPES, C.A. & BOITEUX, L.A. 2004. Biovar-specific and broad-spectrum sources of resistance to bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) in *Capsicum*. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 4:350-355.
- LOPES, C.A.; QUEZADO-SOARES, A.M. & DE MELO, P.E. 1994. Differential resistance of tomato cultivars to biovars I and III of *Pseudomonas solanacearum*. *Plant Disease* 78:1091-1094.
- LOPES, C.A.; ROSSATO, M. & BOITEUX, L.S. 2015. The host status of coffee (*Coffea arabica*) to *Ralstonia solanacearum* phylotype I isolates. *Tropical Plant Pathology* 40:1-4.
- MADDEN, T.L.; TATUSOV, R.L. & ZHANG, J. 1996. Applications of network BLAST server. *Methods in Enzymology* 266:131-141.
- MAHUKU, G.S. 2004. A simple extraction method suitable for PCR-based analysis of plant, fungal, and bacterial DNA. *Plant Molecular Biology Reporter* 22:71-81.
- MARQUES, E.; UESUGI, C.H.; FERREIRA, M.A.S.V. & REZENDE, D.V.D. 2012. Characterization of isolates of *Ralstonia solanacearum* biovar 2, pathogenic to *Eucalyptus* "urograndis" hybrids. *Tropical Plant Pathology* 37:399-408.
- MICHELMORE, R.W.; PARAN, I. & KESSELI, R.V. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 88:9828-9832.



- NETTO, R.A.C.; PEREIRA, B.G.; NODA, H. & BOHER, B. 2003. Caracterização de isolados de *Ralstonia solanacearum* obtidos de tomateiros em várzea e em terra firme, no Estado do Amazonas. *Fitopatologia Brasileira* 28:362-366.
- NORMAN, D.J.; ZAPATA, M.; GABRIEL, D.W.; DUAN, Y.; YUEN, J.M.; MANGRAVITANOVO, A. & DONAHOO, R.S. 2009. Genetic diversity and host range variation of *Ralstonia solanacearum* strains entering North America. *Phytopathology* 99:1070-1077.
- NOURI, S.; BAHAR, M. & FEGAN, M. 2009. Diversity of *Ralstonia solanacearum* causing potato bacterial wilt in Iran and the first record of phylotype II/biovar 2T strains outside South America. *Plant Pathology* 58:243-249.
- OPINA, N.; TAVNER, F.; HOLLWAY, G.; WANG, J.; LI, T.; MAGHIRANG, R.; FEGAN, M.; HAYWARD, A.; KRISHNAPILLAI, V. & HONG, W. 1997. A novel method for development of species and strain-specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* 5:19-30.
- PAN, Z.; XU, J.; PRIOR, P.; XU, J.; ZHANG, H.; CHEN, K.; TIAN, Q.; ZHANG, L.; LIU, L. & HE, L. 2013. Development of a specific molecular tool for the detection of epidemiologically active mulberry causing-disease strains of *Ralstonia solanacearum* phylotype I (historically race 5-biovar 5) in China. *European Journal of Plant Pathology* 137:377-391.
- PARAN, I. & MICHELMORE, R.W. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics* 85:985-993.
- PRIOR, P.; STEVA, H. & CADET, P. 1990. Aggressiveness of stains of *Pseudomonas solanacearum* from the French West Indies (Martinique and Guadeloupe) on tomato. *Plant Disease* 74:962-965.
- QUARRIE, S.A.; LAZIĆ-JANČIĆ, V.; KOVAČEVIĆ, D.; STEED, A. & PEKIĆ, S. 1999. Bulk segregant analysis with molecular markers and its use for improving drought resistance in maize. *Journal of Experimental Botany* 50:1299-1306.
- REMENANT, B.; COUPAT-GOUTALAND, B.; GUIDOT, A.; CELLIER, G.; WICKER, E.; ALLEN, C.; FEGAN, M.; PRUVOST, O.; ELBAZ, M. & CALTEAU, A. 2010. Genomes of three tomato pathogens within the *Ralstonia solanacearum* species complex reveal significant evolutionary divergence. *BMC Genomics* 11:379-395.
- REZNIKOFF, W.S. 2008. Transposon Tn 5. *Annual review of genetics* 42:269-286.
- SANTANA, B.G.; LOPES, C.A.; ALVAREZ, E.; BARRETO, C.C.; ALLEN, C. & QUIRINO, B.F. 2012. Diversity of Brazilian biovar 2 strains of *Ralstonia solanacearum* *Journal of General Plant Pathology* 78:190-200.

- SANTIAGO, T.R.; LOPES, C.A.; CAETANO-ANOLLÉS, G. & MIZUBUTI, E.S.G. 2016. Phylotype and sequevar variability of *Ralstonia solanacearum* in Brazil, an ancient center of diversity of the pathogen. *Plant Pathology*.
- SEAL, S.; JACKSON, L.; YOUNG, J. & DANIELS, M. 1993. Differentiation of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas pickettii* and the blood disease bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. *Journal of general microbiology* 139:1587-1594.
- STULBERG, M.J.; SHAO, J. & HUANG, Q. 2015. A multiplex PCR assay to detect and differentiate select agent strains of *Ralstonia solanacearum*. *Plant Disease* 99:333-341.
- TAKATSU, A. & LOPES, C.A. 1997. Murcha bacteriana em hortaliças: avanços científicos e perspectivas de controle. *Horticultura Brasileira* 15:170-177.
- UNTERGASSER, A.; CUTCUTACHE, I.; KORESSAAR, T.; YE, J.; FAIRCLOTH, B.C.; REMM, M. & ROZEN, S.G. 2012. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40:e115.
- WENGER, J.W.; SCHWARTZ, K. & SHERLOCK, G. 2010. Bulk segregant analysis by high-throughput sequencing reveals a novel xylose utilization gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genetics* 6:e1000942.
- WICKER, E.; GRASSART, L.; CORANSON-BEAUDU, R.; MIAN, D.; GUILBAUD, C.; FEGAN, M. & PRIOR, P. 2007. *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential. *Applied and Environmental Microbiology* 73:6790-6801.
- WICKER, E.; LEFEUVRE, P.; DE CAMBIAIRE, J.-C.; LEMAIRE, C.; POUSSIER, S. & PRIOR, P. 2012. Contrasting recombination patterns and demographic histories of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from MLSA. *The ISME Journal* 6:961-974.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A. & TINGEY, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18:6531-6535.
- WILLIAMSON, L.; NAKAHO, K.; HUDELSON, B. & ALLEN, C. 2002. *Ralstonia solanacearum* race 3, biovar 2 strains isolated from geranium are pathogenic on potato. *Plant Disease* 86:987-991.
- XU, X.; CHAO, J.; CHENG, X.; WANG, R.; SUN, B.; WANG, H.; LUO, S.; XU, X.; WU, T. & LI, Y. 2016. Mapping of a novel race specific resistance gene to *Phytophthora* root rot of pepper (*Capsicum annuum*) using bulked segregant analysis combined with specific length amplified fragment sequencing strategy. *PloS One* 11:e0151401.

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

# CAPÍTULO 3

---

---

**BUSCA POR FONTES DE RESISTÊNCIA A ISOLADOS DE *Ralstonia solanacearum* DIVERGENTES EM RELAÇÃO À CAPACIDADE DE INFECTAR A LINHAGEM *Solanum lycopersicum* ‘HAWAII 7996’**

**Busca por fontes de resistência a isolados de *Ralstonia solanacearum* divergentes em relação à capacidade de infectar a linhagem *Solanum lycopersicum* ‘Hawaii 7996’**

**RESUMO**

O controle da murcha bacteriana do tomateiro causada pelo complexo de espécies de *Ralstonia* pode ser feito com o uso de cultivares resistentes. No entanto, a existência de isolados capazes de suplantar a resistência da linhagem ‘Hawaii 7996’ ressalta a necessidade de antecipar ações de pesquisa nos programas de melhoramento visando buscar por novas fontes de resistência para esses isolados considerados atípicos. O objetivo deste capítulo foi avaliar uma coleção de genótipos de tomateiro silvestre da espécie *Solanum peruvianum* visando identificar fontes de resistência a dois isolados contrastantes quanto a capacidade de suplantar a resistência da linhagem ‘Hawaii 7996’. Foram empregados os isolados *R. solanacearum* CNPH-RS 488 (da raça 3/biovar 2A, que foi reportado suplantando a resistência de ‘Hawaii 7996’ no Estado do Paraná) e ao isolado *R. solanacearum* CNPH-RS 489 (da raça 1/biovar 1 para o qual a linhagem ‘Hawaii 7996’ se mostra resistente). As respostas dos 75 genótipos de *S. peruvianum* foram comparadas aos controles resistente (‘Hawaii 7996’) e a suscetível (linhagem ‘L390’). Em uma inoculação por aspersão do torrão da plântula com suspensão bacteriana na concentração a  $10^7$  ufc/mL foi possível observar, em três dias após a inoculação, o aparecimento de plantas murchas da linhagem suscetível ‘L390’. A diferença entre respostas dos genótipos de *S. peruvianum* para os dois isolados empregados no presente estudo ressaltam um possível envolvimento de diferentes mecanismos de resistência. Para o isolado CNPH-RS 488, 16 acessos foram promissores, contra 31 para o isolado CNPH-RS 489. Somente sete acessos (‘CNPH 201’, ‘CNPH 864’, ‘CNPH 938’, ‘CNPH 940’, ‘CNPH 1035’, ‘CNPH 1194’ e ‘CNPH 1382’) apresentaram resistência simultânea para os dois isolados.

**Palavras-chave:** germoplasma, murcha bacteriana e *Solanum peruvianum*.

**Search for sources of resistance to *Ralstonia solanacearum* isolates that display contrasting abilities to infect the *Solanum lycopersicum* ‘Hawaii 7996’**

**ABSTRACT**

The control of the bacterial wilt of tomatoes (caused by *Ralstonia* species complex) can be accomplished by the use of resistant cultivars and root-stocks. However, the detection of ‘Hawaii 7996’ resistance-breaking isolates highlights the need for preemptive breeding programs, focusing on the search of new resistance sources of resistance for this kind of atypical isolate. The objective of this chapter was to search for new sources of bacterial wilt disease resistance within *Solanum peruvianum* accessions. Two contrasting isolates were employed: *R. solanacearum* CNPH-RS 488 (race 3/ biovar 2A isolate reported causing severe wilt symptoms in ‘Hawaii 7996’-derived material in Paraná State, Brazil) and one standard, non-resistance breaking isolate *R. solanacearum* CNPH-RS, 489 (race 1/biovar 1). The reactions of 75 *S. peruvianum* accessions were compared to the inbred lines ‘Hawaii 7996’ (resistant standard) and ‘L390’ (susceptible standard). The inoculation was carried out by spraying inoculum directly to the plant root system with a bacterial suspension adjusted to  $10^7$  cfu/mL. Symptoms on the susceptible control (‘L390’) start appearing three days after inoculation. The clear-cut differences in the response among *S. peruvianum* accessions for both isolates indicated the potential presence of distinct resistance mechanisms. Sixteen accessions displayed promising resistant reaction to the isolate CNPH-RS 488 and 31 to the CNPH-RS 489 isolate. Only seven (‘CNPH 201’, ‘CNPH 864’, ‘CNPH 938’, ‘CNPH 940’, ‘CNPH 1035’, ‘CNPH 1194’, and ‘CNPH 1382’) out of the 75 *S. peruvianum* accessions showed resistance to both isolates.

**Keywords:** bacterial wilt, germplasm and *Solanum peruvianum*.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. O complexo de espécies de *Ralstonia*, agente causal da murcha bacteriana do tomateiro.

O complexo de espécies de *Ralstonia* (CER) (agente causal da murcha bacteriana) é um dos principais grupos de fitopatógenos do mundo, afetando mais de 200 espécies de plantas em 50 famílias botânicas (Genin & Denny, 2012). No Brasil, a murcha bacteriana é considerada um dos principais problemas sanitários do cultivo do tomateiro e outras solanáceas em condições de cultivo protegido e é o principal fator limitante para produção de tomate na região amazônica (Lopes, 2015).

Originalmente o CER foi classificado em raças (Buddenhagen *et al.*, 1962), biovares (Hayward, 1964), filotipos e sequevares (Fegan & Prior, 2005). Essa extensa variabilidade indicava que esse grupo de patógenos era composto por um complexo de espécies. De fato, tratamentos taxonômicos mais recentes (levando em consideração técnicas genômicas e proteômicas) resultaram na divisão do táxon em três espécies distintas: *Ralstonia solanacearum*, *R. pseudosolanacearum* e *R. syzygii* (Safni *et al.*, 2014). A espécie *R. solanacearum*, previamente composta por isolados da raça 3/biovar 2, era originalmente considerada a “raça da batata” (Hayward, 1991). O relato da murcha bacteriana em gerânio no Brasil indicou o agente causal como sendo um isolado da biovar 2 (Almeida *et al.*, 2003). Essa doença do gerânio veio se tornar um problema sério nos Estados Unidos e no continente europeu, em que estacas com infecções latentes levaram à disseminação da doença (Norman *et al.*, 2009). Em 2012 foram relatados isolados da biovar 2 causando murcha em plantações de *Eucalyptus* (Marques *et al.*, 2012). Diversos outros relatos de hospedeiras dessa raça e biovar foram feitos no mundo, ressaltando que isolados raça 3/biovar 2, antes considerados restritos à batata e outras solanáceas, apresentam, na realidade, uma maior gama de hospedeiras.

Isolados do CER são um grande desafio para a produção do tomateiro no Brasil e no mundo. Esse grupo de patógenos se destaca pela persistência no solo por longos períodos, podendo também colonizar a rizosfera de plantas invasoras e/ou nativas, favorecendo a manutenção de sua população de um cultivo a outro (Lin *et al.*, 2009).

## **1.2. O controle da murcha bacteriana via melhoramento genético**

A murcha bacteriana é uma doença extremamente destrutiva, com muitos relatos de perdas que variam de acordo com a cultura. No cultivo do tomateiro, são comuns os registros de perdas totais, na batata, de 33 a 90%; na banana, 80 a 100%; e no amendoim de 20% (Elphinstone, 2005).

Entre 1997 e 2005 foram relatados na literatura cerca de 450 estudos sobre o CER, 24% desses abordando melhoramento e 18% sobre controle e manejo (Elphinstone, 2005; Nion & Toyota, 2015). De fato, poucas opções de controle da murcha bacteriana estão disponíveis; entre elas pode-se citar a rotação de culturas (Yadessa *et al.*, 2010; Deberdt *et al.*, 2015), agentes de controle biológico (Yamamoto *et al.*, 2015) e técnicas de enxertia (Rivard *et al.*, 2012; Lopes & Mendonça, 2016). Entretanto, a estratégia mais eficiente e prática tem sido, quando disponível, o uso de cultivares resistentes, devido ao seu baixo custo, maior eficiência e menor dano ao meio ambiente (Strange & Scott, 2005; Jianwei *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2013; Hanson *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2016).

Em tomateiro uma das fontes mais empregadas tem sido a linhagem *Solanum lycopersicum* ‘Hawaii 7996’, considerada como padrão de resistência à murcha bacteriana (Wang *et al.*, 2013). A resistência de ‘Hawaii 7996’ é determinada por diversos QTLs que conferem um amplo espectro de eficiência (Wang *et al.*, 1998; Carmeille *et al.*, 2006a; Lebeau *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013). Como relatado por Wang *et al.* (2013) e Wang *et al.* (1998), a resistência derivada de ‘Hawaii 7996’ tem se mostrado estável e de amplo espectro, com



elevadas taxas de sobrevivência em experimentos de campo conduzidos em 11 países em diferentes continentes. ‘Hawaii 7996’ e os materiais derivados dessa linhagem têm sido empregados como porta-enxertos, apresentando resultados positivos em termos da expressão da resistência contra isolados de raça 1 biovar 1 (filotipo II) e raça 1 biovar 3 (filotipo I) (Lopes *et al.*, 2015).

Devido a esse conjunto de características, o acesso ‘Hawaii 7996’ tem sido largamente usado em programas de melhoramento genético visando incorporar a resistência para murcha bacteriana. No entanto, para diversificar a base genética da resistência, distintas fontes derivadas de espécies selvagens também têm sido empregadas, tais como acessos de *S. pennellii* (Hai *et al.*, 2008), *S. pimpinellifolium* (Jaworski *et al.*, 1987) e *S. peruvianum* (Carmeille *et al.*, 2006b).

### **1.3. *Solanum peruvianum* e seu potencial como fonte de genes de resistência a doenças**

A espécie *S. peruvianum* foi inicialmente classificada como *Lycopersicum peruvianum* (L.) Miller. Estudos taxonômicos mais recentes subdividiram essa espécie em quatro taxa filogeneticamente relacionados: *S. peruvianum*, *S. huaylasense*, *S. corneliomuelleri* e *S. arcanum* (Peralta *et al.*, 2005). *Solanum peruvianum* é uma espécie selvagem de tomateiro, primariamente encontrada no Peru e também ao longo do litoral Oeste da América do Sul, nos Andes e norte do Chile (Chetelat *et al.*, 2009). No Chile, a espécie *S. peruvianum* está amplamente disseminada como uma planta invasora em consequência de sua elevada fecundidade (mais sementes por fruto e com florescimento mais precoce) quando comparada com outras espécies do gênero *Solanum* (Chetelat *et al.*, 2009). *Solanum peruvianum* é considerada a espécie mais variável entre os parentes selvagens do tomateiro (Julián *et al.*, 2013). É uma espécie predominantemente auto-incompatível. Além disso, seu uso como parental feminino (receptor de pólen) em cruzamentos interespecíficos com acessos de

tomateiro tem sido evitado devido à existência de incompatibilidade unilateral (Hogenboom, 1972; Julián *et al.*, 2013). Outra complicação associada com o uso de *S. peruvianum* no melhoramento do tomateiro tem sido os baixos níveis de compatibilidade de cruzamento com o tomateiro cultivado (*S. lycopersicum*), demandando, muitas vezes, a necessidade de estratégias de resgate de embrião *in vitro* (Domínguez *et al.*, 2005).

Mesmo diante dessas limitações, a espécie *S. peruvianum* tem sido extensivamente empregada no melhoramento genético do tomateiro devido aos inúmeros fatores de resistência contra estresses abióticos (Julián *et al.*, 2013) tais como: tolerância à salinidade (Tal, 1971) e tolerância ao frio (Fernández-Muñoz *et al.*, 1995). Além disso, acessos dessa espécie representam uma fonte de inúmeros genes de resistência contra fatores bióticos (doenças e artrópodes-praga) que estão atualmente sendo empregados nos programas de melhoramento genético do tomateiro.

Mais de 40 genes de resistência foram caracterizados em *S. peruvianum* e outras espécies selvagens (Rick & Chetelat, 1995). Acessos de *S. peruvianum* foram fontes de importantes genes de resistência tais como: *Asc* para resistência ao fungo *Alternaria alternata* (van der Biezen *et al.*, 1995), *Fr1* para *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Vakalounakis *et al.*, 1997), *py-1* para resistência ao fungo *Pyrenochaeta lycopersici* (Doganlar *et al.*, 1998), *Tm-2-2* para resistência a distintos patótipos de *Tomato mosaic virus* (Young *et al.*, 1988), *Sw-5* que controla resistência ampla contra espécies de *Tospovirus* (Stevens *et al.*, 1991; Boiteux & Giordano, 1993; Stevens *et al.*, 1995), *Ve* para *Verticillium dahliae* raça 1 (Diwan *et al.*, 1999), *Mi-1* e *Mi-3* para resistência aos nematoides das galhas (Yaghoobi *et al.*, 2005) e fatores de resistência quantitativa ao cancro bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) (Sen *et al.*, 2013). Em relação os agentes causadores da murcha bacteriana, existem relatos de acessos de *S. peruvianum* com resistência parcial à raça 3 biovar 2 (filotipo II) (Carmeille *et al.*, 2006b).

O presente trabalho tem como objetivo ampliar a caracterização de acessos de espécies silvestres do gênero *Solanum* e explorar o potencial uso do germoplasma de *S. peruvianum* no melhoramento genético para resistência aos agentes causadores da murcha bacteriana. Além disso, é importante antecipar a busca por fontes de resistência contra novos isolados com perfil de virulência mais amplo e capazes de “quebrar” a resistência da linhagem ‘Hawaii 7996’. Essa estratégia (denominada de melhoramento antecipatório ou ‘preemptive breeding’) é importante visando encontrar soluções genéticas antes que a potencial disseminação desses isolados se torne um problema epidêmico. Neste contexto, o presente trabalho representa uma busca por novas fontes de resistência à murcha bacteriana em uma coleção de 75 genótipos da espécie *S. peruvianum*, utilizando o isolado CNPH-RS 488 (que é capaz de quebrar a resistência da linhagem ‘Hawaii 7996’) e um isolado da raça 1/biovar 1 (CNPH-RS 489) que não se mostra virulento nessa linhagem.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Seleção de isolados**

O isolado CNPH-RS 488 foi obtido em 2012 a partir de plantas de porta-enxerto comercial de tomateiro (catalogado como sendo resistente à murcha bacteriana) que apresentava severos sintomas da doença em Grandes Rios, no Estado do Paraná. Experimentos conduzidos posteriormente na Embrapa Hortaliças confirmaram a capacidade, desse isolado, em “quebrar” a resistência da linhagem *S. lycopersicum* ‘Hawaii 7996’ (Lopes *et al.*, 2015), reconhecida como uma das principais fontes de resistência à murcha bacteriana (Wang *et al.*, 2013). O isolado CNPH-RS 488 foi posteriormente caracterizado (vide capítulo 2 dessa dissertação) como sendo pertencente à raça 3 (conhecida como “raça da batata”); biovar 2A (geralmente associada com a capacidade de causar murcha em temperaturas mais amenas) (Khoodoo *et al.*, 2010); filotipo II, de origem geográfica no continente americano (Santana *et al.*, 2012), e sequevar 1, que é importante como causador de grandes perdas na cultura da batata

(Guidot *et al.*, 2009). Em outros testes, o isolado CNPH-RS 488 também apresentou uma gama de plantas hospedeiras mais ampla e um perfil de virulência mais amplo, sendo capaz de, inclusive, infectar acessos de berinjela (*S. melongena*), jiló (*S. aethiopicum* var. *gilo*) e *Capsicum* spp., que são mais tolerantes aos isolados de biovar 2 e geralmente mais suscetíveis aos isolados das biovars 1 e 3 (ver capítulo 2).

Outro isolado selecionado foi denominado de CNPH-RS 489. Esse isolado foi caracterizado como sendo da raça 1/biovar 1, que é uma raça associada com uma maior gama de hospedeiras e de origem endêmica no Brasil (Lopes, 2005) e filotipo II. A sequevar desse isolado ainda não foi determinada. Em testes prévios foi demonstrada sua maior agressividade em tomateiro, se tornando um isolado com potencial valor em sistemas de seleção de genótipos resistentes. Ambos os isolados são da coleção de bactérias da Embrapa Hortaliças, que são mantidos armazenados em tubos criogênicos com água mineral sob condições de temperatura ambiente.

## **2.2. Genótipos utilizados nas avaliações**

Setenta e cinco genótipos de *S. peruvianum* pertencentes ao banco de germoplasma da Embrapa Hortaliças foram selecionados para serem desafiados com os isolados CNPH-RS 488 e CNPH-RS 489. As linhagens testemunhas foram a ‘Hawaii 7996’ (padrão de resistência) e ‘L390’ (padrão de suscetibilidade) (Wang *et al.*, 2013; Kurabachew & Wydra, 2014). Os genótipos foram semeados em bandejas de poliestireno de 128 células preenchidas com substrato esterilizado. Plantas foram mantidas em casa de vegetação até o estágio fisiológico de quatro folhas verdadeiras.

## **2.3. Preparo do inóculo**

Os isolados foram riscados em placas de Petri com meio CPG (Kelman, 1954) com modificações (substituição da glicose por glicerol) e incubados em câmara de crescimento por

48 horas, 28°C. Após esse período, colônias típicas foram selecionadas e repicadas. Para a produção do inóculo, as colônias foram raspadas com a ajuda de uma alça de Drigalsky e transferidas para um béquer com água. As suspensões foram homogeneizadas e calibradas para  $10^7$  UFC/mL com um espectrofotômetro, logo em seguida colocadas em vasilhames com borrifadores portáteis manuais.

#### **2.4. Inoculação e avaliação**

Para a inoculação, as plantas foram removidas da bandeja e o torrão foi pulverizado com aproximadamente 4 mL de suspensão bacteriana contendo cerca de  $5 \times 10^7$  ufc/mL (Lopes *et al.*, 2015). As diferenças no padrão de desenvolvimento inicial das linhagens testemunhas ('L390' e 'Hawaii 7996') e dos genótipos de *S. peruvianum* em avaliação dificultaram a padronização da idade fisiológica da planta no momento da inoculação. No entanto, a maioria dos genótipos foi inoculada com cerca de quatro folhas verdadeiras. Imediatamente após a inoculação, as plantas foram transferidas para vasos de 0,5 L e mantidas na casa de vegetação, com temperatura oscilando entre 20 e 40 °C com aquecimento suplementar noturno. Plantas "inoculadas" apenas com água destilada foram usadas como controle negativo. As avaliações começaram aos três dias após a inoculação devido à alta suscetibilidade de alguns genótipos e continuaram por até 13 dias após a inoculação. O experimento foi delineado como inteiramente casualizado com duas repetições com número variado de plantas por genótipo, devido à variação na germinação das sementes. A análise de área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) foi calculada por meio dos programas computacionais Excel<sup>®</sup> do Microsoft Office 2016<sup>®</sup> e a análise estatística pelo programa SISVAR (Ferreira, 2011) pelo método de Scott-Knott 5%.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Avaliação de genótipos de tomateiro do banco de germoplasma da Embrapa Hortaliças

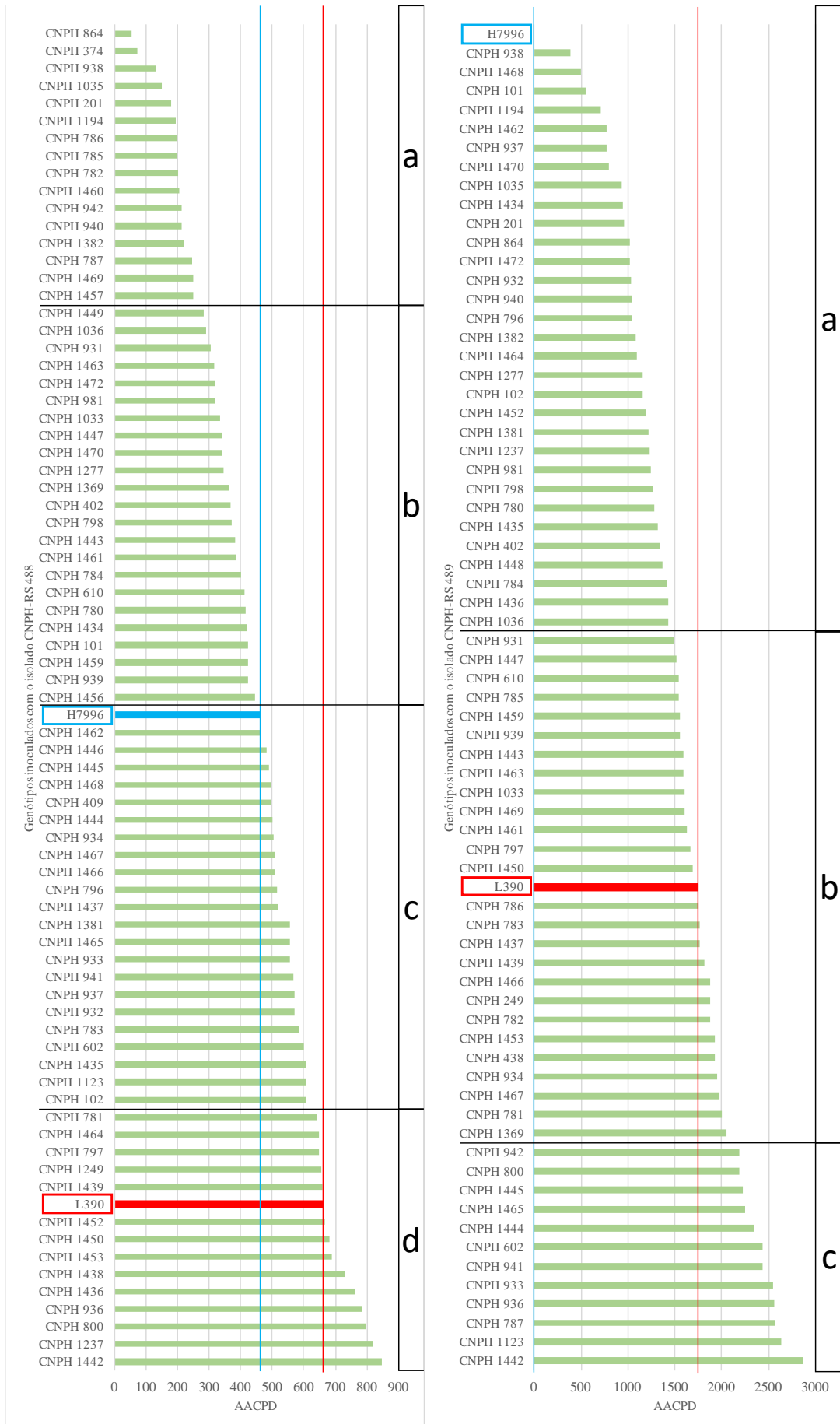
As inoculações com os dois isolados indicaram divergências em relação às respostas dos genótipos de *S. peruvianum* e das duas linhagens testemunhas ('Hawaii 7996' e 'L390') (**Figura 11**). O controle suscetível 'L390' murchou rapidamente com ambos os isolados, confirmando a virulência do inóculo. Nenhuma das plantas do controle negativo (com água) apresentou sintomas.

O isolado CNPH-RS 488, mesmo causando níveis mais elevados de doença, não foi capaz de causar murcha em 100% das plantas avaliadas, indicando a existência de genótipos com potencial uso no melhoramento genético (**Figura 11**). Quatro grupos foram formados após análise estatística da frequência de plantas murchas usando o isolado CNPH-RS 488. O grupo A foi formado por 16 genótipos classificados com elevada resistência; o grupo B, composto por 23 genótipos, com resistência intermediária alta; grupo C, formado por 22 genótipos com resistência intermediária baixa (incluindo a linhagem 'Hawaii 7996'); e o grupo D composto por 14 genótipos que foram classificados com tendo baixa resistência (incluindo o controle suscetível 'L390'). A linhagem 'Hawaii 7996' foi incluída no grupo de genótipos significativamente menos suscetíveis que os demais.

Os 69 genótipos avaliados com o isolado CNPH-RS 489 foram divididos em três grupos estatísticos de acordo com a reação à inoculação. O grupo A (identificado como resistente), foi formado por 31 genótipos (incluindo a linhagem 'Hawaii 7996'); o grupo B (de resistência intermediária) foi composto por 26 genótipos (juntamente com a linhagem 'L390'); e o grupo C foi formado por 12 genótipos classificados como sendo suscetíveis, ou seja, *S. peruvianum* apresenta acessos ainda mais suscetíveis do que 'L390' (padrão de suscetibilidade). Entretanto, pode ter sido devido à interferência da idade fisiológica da muda inoculada, maior para L390,

que provavelmente germinou mais rapidamente e teve maior vigor. Considerando esse resultado, somente os genótipos componentes do grupo A apresentaram níveis promissores de resistência ao isolado CNPH-RS 489.

Não foi possível comparar os valores absolutos de AACPD entre o isolado CNPH-RS 488 (biovar 2A) e o isolado CNPH-RS 489 (biovar 1), uma vez que a velocidade e os índices de murcha divergiram entre os experimentos. Para o isolado CNPH-RS 488, a murcha dos genótipos suscetíveis ocorreu mais rapidamente (**Figura 11**), forçando o encerramento do experimento mais cedo, quando comparado com o ensaio conduzido com o isolado CNPH-RS 489. Com o isolado CNPH-RS 488 ocorreu suplantação de resistência, resultando em plantas murchas na testemunha resistente ‘Hawaii 7996’, o mesmo não ocorreu com o isolado CNPH-RS 489, que não induziu murcha nessa linhagem. A linhagem ‘L390’ se agrupou sempre entre os genótipos de media alta ou alta suscetibilidade nos dois experimentos. Foi possível verificar divergências nos níveis de resistência/suscetibilidade entre os genótipos ao isolado CNPH-RS 489. A linhagem ‘Hawaii 7996’ não apresentou nenhuma planta murcha, enquanto que os demais genótipos não alcançaram esse nível de resistência para esse isolado de biovar 1. Genótipos originalmente identificados como resistentes ao CNPH-RS 489 não apresentaram, de maneira consistente, resposta similar quando inoculados com o isolado CNPH-RS 488. Os resultados das inoculações confirmaram, portanto, que a linhagem ‘Hawaii 7996’, é resistente ao isolado CNPH-RS 489, mas se mostrou suscetível (grupo de resistência intermediária baixa) quando inoculada com o isolado CNPH-RS 488.





**Figura 11.** Gráfico da análise da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) de 75 genótipos de *Solanum peruvianum* avaliados quanto sua resistência à murcha bacteriana com os isolados CNPH-RS 488 (raça 3/biovar 2A) e CNPH-RS 489 (raça 1/biovar 1). Os acessos foram comparados com as linhagens ‘Hawaii 7996’ (controle resistente) e ‘L390’ (controle suscetível). A barra vermelha indica o resultado da linhagem suscetível (‘L390’) e em azul o resultado da linhagem resistente (‘Hawaii 7996’). Quadros com letras indicam os grupos estatísticos formados pelo teste Scott-Knott ao nível de significância de 5%.

#### 4. DISCUSSÃO

Segundo Hayward (1991) e Lopes & Boiteux (2012) a resposta de resistência pode variar de acordo com método de inoculação, a concentração do inóculo e as condições ambientais. Boiteux & Monma (1994) também observaram diferenças na frequência de escapes devido à inoculação de mudas com diferentes idades. A rápida murcha do genótipo ‘L390’ nos dois ensaios e a sobrevivência de diversos genótipos em avaliação indicaram que tanto a concentração de inóculo como as condições ambientais foram adequadas para discriminar a resposta dos genótipos. A eficiência para a comparação de genótipos apresentada pelo método de inoculação com jatos da suspensão bacteriana em torrões intactos se deve ao fato de que a remoção das mudas da bandeja *per se* já promove algum dano aos sistemas radiculares, servindo de porta de entrada para o patógeno.

Os índices de murcha encontrados nas linhagens testemunhas confirmam dados anteriores de que ‘L390’ é adequada como controle suscetível (Kurabachew & Wydra, 2013; Li *et al.*, 2014; Hanson *et al.*, 2016). A linhagem ‘Hawaii 7996’ tem sido empregada como controle resistente (Wang *et al.*, 1998), porém já existem relatos que essa resistência pode ser “quebrada” por alguns isolados (Milling *et al.*, 2011), fato também observado no presente trabalho (vide capítulo 1). Mostrando a importância que representa identificar algum acesso que possa ser usado como referência de resistência quando se for avaliar para a raça 3/biovar 2.

A caracterização da agressividade e virulência do isolado CNPH-RS 488 na linhagem *S. lycopersicum* ‘Hawaii 7996’ foi o tema do capítulo 1 da presente tese. No entanto, não foi possível, pelos testes empregados, elucidar alguns dos fatores associados com essa característica peculiar desse isolado. Os mecanismos poderão ser potencialmente elucidados por meio do sequenciamento deste isolado e pela análise de regiões do genoma que indiquem a presença de fatores genéticos associados com a capacidade de quebra de resistência, assim como outras características que esse isolado possa ter em comparação com outros isolados da biovar 2A (de elevada agressividade) que foram previamente sequenciados, tais como o UY031 do Uruguai (Guarisch-Sousa *et al.*, 2016).

A identificação de genótipos de *S. peruvianum* com índices de doença inferiores ao do ‘Hawaii 7996’ após inoculação com o isolado CNPH-RS 488 demonstra a possibilidade do uso desses genótipos como fontes de resistência. Servindo como alternativas para expandir a base genética para essa característica em programas de melhoramento genético do tomateiro e antecipar problemas decorrentes da potencial expansão geográfica de isolados com perfil de virulência similar ao do isolado CNPH-RS 488.

*Solanum peruvianum* já foi amplamente utilizada como fonte doadora de fatores de resistência estáveis e duráveis contra uma gama de patógenos tais como *A. alternata* (van der Biezen *et al.*, 1995), *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Vakalounakis *et al.*, 1997); *P. lycopersici* (Doganlar *et al.*, 1998), ToMV (Young *et al.*, 1988); *Tospovirus* (Stevens *et al.*, 1991; Stevens *et al.*, 1995), *V. dahliae* (Diwan *et al.*, 1999), nematoides das galhas (Yaghoobi *et al.*, 2005) e cancro bacteriano (*C. michiganensis* subsp. *michiganensis*) (Sen *et al.*, 2013).

Para o CER, já existem relatos de genótipos de *S. peruvianum* apresentando resistência a diferentes isolados, em especial da raça 3/biovar 2 (filotipo II) (Kim *et al.*, 2016). Carneille *et al.* (2006b) relataram genótipos moderadamente resistentes em germoplasma de *S. peruvianum*.

Em um trabalho de avaliação de germoplasma conduzido por Hai *et al.* (2008) foram avaliados 252 acessos de tomateiros selvagens, entre esses, 42 de *S. peruvianum*, porém nenhum se mostrou resistente, ou seja, com resistência similar à da linhagem ‘Hawaii 7996’. Kim *et al.* (2016) identificaram somente duas fontes de resistência (com média de 0 a 50% de folhas murchas por planta) em uma coleção de 285 genótipos desta espécie.

A diferença entre respostas dos genótipos de *S. peruvianum* para os dois isolados empregados no presente estudo ressaltam um possível envolvimento de diferentes mecanismos de resistência. Para o isolado CNPH-RS 488, 16 acessos foram promissores, contra 31 para o isolado CNPH-RS 489. No entanto, somente sete acessos (‘CNPH 201’, ‘CNPH 864’, ‘CNPH 938’, ‘CNPH 940’, ‘CNPH 1035’, ‘CNPH 1194’ e ‘CNPH 1382’) apresentaram resistência simultânea para os dois isolados.

A resistência do tipo filotipo I-específica conferida pelo QTL *Bwr-12* na linhagem ‘Hawaii 7996’ está associada com limitação da colonização bactéria (Wang *et al.*, 2013). Já o QTL *Bwr-6* também contribui com a resistência para filotipo I e amplia a resistência para isolados da raça 3/biovar 2. Essa resistência está em estreita ligação (em repulsão) ou pode ser alélica ao *locus Mi* (que confere resistência a espécies de *Meloidogyne*), dificultando a piramidização dessas duas características (Deberdt *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2013). No presente trabalho não foi utilizado nenhum isolado do filotipo I (raça 1/biovar 3) para confirmar se os acessos promissores de *S. peruvianum* também apresentam resistência à infecção contra essas variantes, impedindo uma análise adequada quanto a essa capacidade. Os mecanismos de resistência à murcha bacteriana associados com a espécie *S. peruvianum* nunca foram elucidados e os potenciais fatores genéticos ainda necessitam ser mapeados, o que dificulta, momentaneamente, o processo de melhoramento empregando essas fontes.

Isolados da biovar 2A são reconhecidos por induzir doença em condições de temperaturas mais baixas e são os principais agentes causais de infecções latentes em tubérculos de batata (Ciampi *et al.*, 1980) e em estacas de gerânio (Swanson *et al.*, 2005). Diferentes genótipos de *S. peruvianum* foram identificados apresentando níveis de resistência superiores a aqueles apresentados pela linhagem ‘Hawaii 7996’. Esse fato leva ao questionamento da potencial presença de infecções latentes (Prior *et al.*, 1996) nestes genótipos classificados como resistentes. O mecanismo de resistência, geralmente atribuído à limitação da colonização dos tecidos do sistema vascular (Grimault & Prior, 1993; Bittner *et al.*, 2016) pode ser uma explicação para o não aparecimento de sintomas de murcha, porém pode estar associado com a presença da bactéria nos tecidos da planta. Esse tipo de resistência representa um risco inerentemente associado com patógenos de solo. Para avaliar de forma mais detalhada a eficiência de cultivares resistentes na supressão da doença e de infecções latentes, já existem protocolos empregando isolados geneticamente modificados para emissão de luminescência (Cruz *et al.*, 2014) que podem auxiliar na diagnose de infecções latentes.

## **5. CONCLUSÕES**

\* Alguns acessos de *S. peruvianum* mostraram potencial para uso no melhoramento para a raça 1/biovar 1 e raça 3/biovar 2, inclusive ao isolado CNPH-RS 488 (capaz de suplantar a resistência da linhagem ‘Hawaii 7996’);

\* Essas novas fontes de resistência descritas no presente trabalho podem, desta forma, representar fontes de fatores de resistência visando antecipar o potencial problema de disseminação de isolados com perfil de virulência similar ao observado para o isolado CNPH-RS 488.

## **6. PERSPECTIVAS**

- Realizar coletas para verificar a existência, predominância e proporção de isolados com perfil de virulência similar ao do isolado CNPH-RS 488;

- Sequenciar o genoma completo do isolado CNPH-RS 488 e conduzir análises genômicas comparativas com isolados semelhantes, mas que não são capazes de induzir murcha na linhagem ‘Hawaii 7996’;
- Estudar a capacidade do isolado CNPH-RS 488 de causar murcha em ‘Hawaii 7996’ e outros genótipos em temperaturas mais amenas (ex. 25°C);
- Avaliar a estabilidade da resistência dos novos acessos diante de oscilações de temperaturas e contra uma gama mais ampla de isolados;
- Avaliar os acessos promissores com isolados de *R. pseudosolanacearum* filotipo I (raça 1/biovar 3).

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, I.M.G.; DESTÉFANO, S.A.L.; RODRIGUES NETO, J. & MALAVOLTA JÚNIOR, V.A. 2003. Southern bacterial wilt of geranium caused by *Ralstonia solanacearum* biovar 2/race 3 in Brazil. *Revista de Agricultura* 78:49-56.
- BITTNER, R.J.; ARELLANO, C. & MILA, A.L. 2016. Effect of temperature and resistance of tobacco cultivars to the progression of bacterial wilt, caused by *Ralstonia solanacearum*. *Plant and Soil* 408:1-12.
- BOITEUX, L.S. & GIORDANO, L.D.B. 1993. Genetic basis of resistance against two *Tospovirus* species in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Euphytica* 71:151-154.
- BOITEUX, L.S. & MONMA, S. 1994. Effect of plant age on expression of the resistance to *Pseudomonas solanacearum* in tomato in response to root dipping inoculation. *Fitopatologia Brasileira* 19:102-106.
- BUDDENHAGEN, I.W.; SEQUEIRA, L. & KELMAN, A. 1962. Designation of races of *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 52:726-730.
- CARMEILLE, A.; CARANTA, C.; DINTINGER, J.; PRIOR, P.; LUISETTI, J. & BESSE, P. 2006a. Identification of QTLs for *Ralstonia solanacearum* race 3-phyloptype II resistance in tomato. *Theoretical and Applied Genetics* 113:110-121.
- CARMEILLE, A.; PRIOR, P.; KODJA, H.; CHIROLEU, F.; LUISETTI, J. & BESSE, P. 2006b. Evaluation of resistance to race 3, biovar 2 of *Ralstonia solanacearum* in tomato germplasm. *Journal of Phytopathology* 154:398-402.

- CHETELAT, R.T.; PERTUZÉ, R.A.; FAÚNDEZ, L.; GRAHAM, E.B. & JONES, C.M. 2009. Distribution, ecology and reproductive biology of wild tomatoes and related nightshades from the Atacama Desert region of northern Chile. *Euphytica* 167:77-93.
- CIAMPI, L.; SEQUEIRA, L. & FRENCH, E.R. 1980. Latent infection of potato tubers by *Pseudomonas solanacearum*. *American Potato Journal* 57:377-386.
- CRUZ, A.P.Z.; FERREIRA, V.; PIANZZOLA, M.J.; SIRI, M.I.; COLL, N.S. & VALLS, M. 2014. A novel, sensitive method to evaluate potato germplasm for bacterial wilt resistance using a luminescent *Ralstonia solanacearum* reporter strain. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 27:277-285.
- DEBERDT, P.; GOZÉ, E.; CORANSON- BEAUDU, R.; PERRIN, B.; FERNANDES, P.; LUCAS, P. & RATNADASS, A. 2015. *Crotalaria spectabilis* and *Raphanus sativus* as Previous Crops Show Promise for the Control of Bacterial Wilt of Tomato Without Reducing Bacterial Populations. *Journal of Phytopathology* 163:377-385.
- DEBERDT, P.; OLIVIER, J.; THOQUET, P.; QUÉNÉHERVÉ, P. & PRIOR, P. 1999. Evaluation of bacterial wilt resistance in tomato lines nearly isogenic for the Mi gene for resistance to root-knot. *Plant Pathology* 48:415-424.
- DIWAN, N.; FLUHR, R.; ESHED, Y.; ZAMIR, D. & TANKSLEY, S.D. 1999. Mapping of Ve in tomato: a gene conferring resistance to the broad-spectrum pathogen, *Verticillium dahliae* race 1. *Theoretical and Applied Genetics* 98:315-319.
- DOGANLAR, S.; DODSON, J.; GABOR, B.; BECK-BUNN, T.; CROSSMAN, C. & TANKSLEY, S.D. 1998. Molecular mapping of the py-1 gene for resistance to corky root rot (*Pyrenochaeta lycopersici*) in tomato. *Theoretical and Applied Genetics* 97:784-788.
- DOMÍNGUEZ, E.; CUARTERO, J. & FERNÁNDEZ-MUÑOZ, R. 2005. Breeding tomato for pollen tolerance to low temperatures by gametophytic selection. *Euphytica* 142:253-263.
- ELPHINSTONE, J.G. 2005. 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*. 1 ed. APS Press. Estados Unidos. p. 9-28.
- FEGAN, M. & PRIOR, P. 2005. 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*. 1 ed. APS Press. Estados Unidos. p. 449-461.
- FERNÁNDEZ-MUÑOZ, R.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, J.J. & CUARTERO, J. 1995. Genetics of the viability of pollen grain produced at low temperatures in *Lycopersicon* Mill. *Euphytica* 84:139-144.
- FERREIRA, D.F. 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia* 35:1039-1042.

- GENIN, S. & DENNY, T.P. 2012. Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* species complex. Annual Review of Phytopathology 50:67-89.
- GRIMAULT, V. & PRIOR, P. 1993. Bacterial wilt resistance in tomato associated with tolerance of vascular tissues to *Pseudomonas solanacearum*. Plant Pathology 42:589-594.
- GUARISCHI-SOUSA, R.; PUIGVERT, M.; COLL, N.S.; SIRI, M.I.; PIANZZOLA, M.J.; VALLS, M. & SETUBAL, J.C. 2016. Complete genome sequence of the potato pathogen *Ralstonia solanacearum* UY031. Standards in Genomic Sciences 11:1-9.
- GUIDOT, A.; ELBAZ, M.; CARRÈRE, S.; SIRI, M.I.; PIANZZOLA, M.J.; PRIOR, P. & BOUCHER, C. 2009. Specific genes from the potato brown rot strains of *Ralstonia solanacearum* and their potential use for strain detection. Phytopathology 99:1105-1112.
- HAI, T.T.H.; ESCH, E. & WANG, J.-F. 2008. Resistance to Taiwanese race 1 strains of *Ralstonia solanacearum* in wild tomato germplasm. European Journal of Plant Pathology 122:471-479.
- HANSON, P.; LU, S.-F.; WANG, J.-F.; CHEN, W.; KENYON, L.; TAN, C.-W.; TEE, K.L.; WANG, Y.-Y.; HSU, Y.-C. & SCHAFLEITNER, R. 2016. Conventional and molecular marker-assisted selection and pyramiding of genes for multiple disease resistance in tomato. Scientia Horticulturae 201:346-354.
- HAYWARD, A. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. Journal of Applied Bacteriology 27:265-277.
- HAYWARD, A.C. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annual Review of Phytopathology 29:65-87.
- HOGENBOOM, N.G. 1972. Breaking breeding barriers in *Lycopersicon*: The genus *Lycopersicon*, its breeding barriers and the importance of breaking these barriers. Euphytica 21:221-227.
- JAWORSKI, C.A.; PHATAK, S.C.; GHATE, S.R.; GITAITIS, R.D. & WIDRLECHNER, M.P. 1987. Ga 1565-2-4 Bwt, Ga 219-1-2 Bwt, Ga 1095-1-4 Bwt, And Ga 1405-1-2 Bwt bacterial wilt-tolerant tomato. HortScience (USA) 22:324-325.
- JIANWEI, L.; HUIFANG, J.; XIAOPING, R.; XIAOJIE, Z. & BOSHOU, L. 2010. Identification and molecular traits of ICRISAT mini core collection of peanut species with resistance to bacterial wilt. Chinese Agriculture Science Bulletin 26:47-51.
- JULIÁN, O.; HERRÁIZ, J.; CORELLA, S.; DI-LOLLI, I.; SOLER, S.; DÍEZ, M.J. & PÉREZ-DE-CASTRO, A. 2013. Initial development of a set of introgression lines from *Solanum peruvianum* PI 126944 into tomato: exploitation of resistance to viruses. Euphytica 193:183-196.

- KELMAN, A. 1954. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology* 44:693-695.
- KHOODOO, M.H.R.; GANOO, E.S. & SAUMTALLY, A.S. 2010. Molecular Characterization and Epidemiology of *Ralstonia solanacearum* Race 3 biovar 2 Causing Brown Rot of Potato in Mauritius. *Journal of Phytopathology* 158:503-512.
- KIM, S.G.; HUR, O.-S.; RO, N.-Y.; KO, H.-C.; RHEE, J.-H.; SUNG, J.S.; RYU, K.-Y.; LEE, S.-Y. & BAEK, H.J. 2016. Evaluation of Resistance to *Ralstonia solanacearum* in Tomato Genetic Resources at Seedling Stage. *The Plant Pathology Journal* 32:58-64.
- KURABACHEW, H. & WYDRA, K. 2013. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria and their potential as bioprotectant against tomato bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Biological Control* 67:75-83.
- KURABACHEW, H. & WYDRA, K. 2014. Induction of systemic resistance and defense-related enzymes after elicitation of resistance by rhizobacteria and silicon application against *Ralstonia solanacearum* in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Crop Protection* 57:1-7.
- LEBEAU, A.; DAUNAY, M.C.; FRARY, A.; PALLOIX, A.; WANG, J.F.; DINTINGER, J.; CHIROLEU, F.; WICKER, E. & PRIOR, P. 2011. Bacterial wilt resistance in tomato, pepper, and eggplant: genetic resources respond to diverse strains in the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Phytopathology* 101:154-165.
- LI, C.-H.; WANG, K.-C.; HONG, Y.-H.; CHU, T.-H.; CHU, Y.-J.; CHOU, I.C.; LU, D.-K.; CHEN, C.-Y.; YANG, W.-C. & LIN, Y.-M. 2014. Roles of different forms of lipopolysaccharides in *Ralstonia solanacearum* pathogenesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 27:471-478.
- LIN, C.-H.; HSU, S.-T.; TZENG, K.-C. & WANG, J.-F. 2009. Detection of race 1 strains of *Ralstonia solanacearum* in field samples in Taiwan using a BIO-PCR method. *European Journal of Plant Pathology* 124:75-85.
- LOPES, C.A. 2005. Murchadeira da batata. 1 Ed. Associação Brasileira da Batata. Itapetininga.
- LOPES, C.A. 2015. Bacterial Wilt - a disease threatening disease of tomato cultivated under warm temperatures. *Comunicado Técnico* 109:4.
- LOPES, C.A.; BOITEUX, L.S. & ESCHEMBAK, V. 2015. Eficácia relativa de porta-enxertos comerciais de tomateiro no controle da murcha-bacteriana. *Horticultura Brasileira* 33:125-130.
- MILLING, A.; BABUJEE, L. & ALLEN, C. 2011. *Ralstonia solanacearum* extracellular polysaccharide is a specific elicitor of defense responses in wilt-resistant tomato plants. *PloS One* 6:e15853.



- NION, Y.A. & TOYOTA, K. 2015. Recent trends in control methods for bacterial wilt diseases caused by *Ralstonia solanacearum*. *Microbes and Environments* 30:1-11.
- PERALTA, I.E.; KNAPP, S. & SPOONER, D.M. 2005. New species of wild tomatoes (*Solanum section Lycopersicon*: Solanaceae) from Northern Peru. *Systematic Botany* 30:424-434.
- PRIOR, P.; BART, S.; LECLERCQ, S.; DARRASSE, A. & ANAIS, G. 1996. Resistance to bacterial wilt in tomato as discerned by spread of *Pseudomonas (Burholderia) solanacearum* in the stem tissues. *Plant Pathology* 45:720-726.
- RICK, C.M. & CHETELAT, R.T. Utilization of related wild species for tomato improvement. *Proceedings of the I International Symposium on Solanacea for Fresh Market* 412, 1995, 21-38.
- RIVARD, C.L.; O'CONNELL, S.; PEET, M.M.; WELKER, R.M. & LOUWS, F.J. 2012. Grafting tomato to manage bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* in the southeastern United States. *Plant Disease* 96:973-978.
- SAFNI, I.; CLEENWERCK, I.; DE VOS, P.; FEGAN, M.; SLY, L. & KAPPLER, U. 2014. Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. and *R. solanacearum* phylotype I and III strains as *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64:3087-3103.
- SANTANA, B.G.; LOPES, C.A.; ALVAREZ, E.; BARRETO, C.C.; ALLEN, C. & QUIRINO, B.F. 2012. Diversity of Brazilian biovar 2 strains of *Ralstonia solanacearum* *Journal of General Plant Pathology* 78:190-200.
- SEN, Y.; FENG, Z.; VANDENBROUCKE, H.; VAN DER WOLF, J.; VISSER, R.G.F. & VAN HEUSDEN, A.W. 2013. Screening for new sources of resistance to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) in tomato. *Euphytica* 190:309-317.
- STEVENS, M.R.; LAMB, E.M. & RHOADS, D.D. 1995. Mapping the Sw-5 locus for *tomato spotted wilt virus* resistance in tomatoes using RAPD and RFLP analyses. *Theoretical and Applied Genetics* 90:451-456.
- STEVENS, M.R.; SCOTT, S.J. & GERGERICH, R.C. 1991. Inheritance of a gene for resistance to *tomato spotted wilt virus* (TSWV) from *Lycopersicon peruvianum* Mill. *Euphytica* 59:9-17.
- STRANGE, R.N. & SCOTT, P.R. 2005. Plant disease: a threat to global food security. *Phytopathology* 43:83-116.

- SWANSON, J.K.; YAO, J.; TANS-KERSTEN, J. & ALLEN, C. 2005. Behavior of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 during latent and active infection of geranium. *Phytopathology* 95:136-143.
- TAL, M. 1971. Salt tolerance in the wild relatives of the cultivated tomato: Responses of *Lycopersicon esculentum*, *L. peruvianum*, and *L. esculentum* minor to sodium chloride solution. *Crop and Pasture Science* 22:631-638.
- VAKALOUNAKIS, D.J.; LATERROT, H.; MORETTI, A.; LIGOXIGAKIS, E.K. & SMARDAS, K. 1997. Linkage between Frl (*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* resistance) and Tm- 2 (tobacco mosaic virus resistance- 2) loci in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Annals of applied biology* 130:319-323.
- VAN DER BIEZEN, E.A.; GLAGOTSKAYA, T.; OVERDUIN, B.; JOHN, H.; NIJKAMP, J. & HILLE, J. 1995. Inheritance and genetic mapping of resistance to *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* in *Lycopersicon pennellii*. *Molecular and General Genetics* 247:453-461.
- WANG, J.-F.; HO, F.-I.; TRUONG, H.T.H.; HUANG, S.-M.; BALATERO, C.H.; DITTAPONGPITCH, V. & HIDAYATI, N. 2013. Identification of major QTLs associated with stable resistance of tomato cultivar 'Hawaii 7996' to *Ralstonia solanacearum*. *Euphytica* 190:241-252.
- WANG, J.F.; HANSON, P. & BARNES, J.A. 1998. Worldwide evaluation of an international set of resistance sources to bacterial wilt in tomato. *In: PRIOR, P.; ALLEN, C. & ELPHINSTONE, J. eds. Bacterial Wilt Disease*. 1 ed. Springer. Alemanha. p. 269-275.
- YADESSA, G.B.; VAN BRUGGEN, A.H.C. & OCHO, F.L. 2010. Effects of different soil amendments on bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* and on the yield of tomato. *Journal of Plant Pathology* 92:439-450.
- YAGHOobi, J.; YATES, J.L. & WILLIAMSON, V.M. 2005. Fine mapping of the nematode resistance gene Mi-3 in *Solanum peruvianum* and construction of a *S. lycopersicum* DNA contig spanning the locus. *Molecular Genetics and Genomics* 274:60-69.
- YAMAMOTO, S.; SHIRAISHI, S.; KAWAGOE, Y.; MOCHIZUKI, M. & SUZUKI, S. 2015. Impact of *Bacillus amyloliquefaciens* S13- 3 on control of bacterial wilt and powdery mildew in tomato. *Pest Management Science* 71:722-727.
- YOUNG, N.D.; ZAMIR, D.; GANAL, M.W. & TANKSLEY, S.D. 1988. Use of isogenic lines and simultaneous probing to identify DNA markers tightly linked to the tm-2a gene in tomato. *Genetics* 120:579-585.
- ZHAO, Y.; ZHANG, C.; CHEN, H.; YUAN, M.; NIPPER, R.; PRAKASH, C.S.; ZHUANG, W. & HE, G. 2016. QTL mapping for bacterial wilt resistance in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Molecular Breeding* 36:1-11.

# CAPÍTULO 4

---

---

**CARACTERIZAÇÃO DO CAFEIRO (*Coffea arabica* – FAMÍLIA RUBIACEAE) COMO HOSPEDEIRO DE ISOLADOS DE *Ralstonia pseudosolanacearum* FILOTIPO I.**

**Caracterização do cafeeiro (*Coffea arabica* – família Rubiaceae) como hospedeiro de isolados de *Ralstonia pseudosolanacearum* filotipo I.**

**RESUMO**

O complexo de espécie de *Ralstonia* apresenta uma ampla gama de hospedeiros, podendo infectar mais de 250 espécies em 54 famílias botânicas, com frequentes novos relatos de novos hospedeiros ou novas variantes infectando hospedeiros já relatados. Níveis elevados de similaridade filogenética foram observados entre os genomas das famílias Rubiaceae e Solanaceae que se refletem no tamanho dos genomas, na organização cromossomal e na composição gênica. Devido a proximidade entre as duas famílias, e a grande quantidade de solanáceas hospedeiras do complexo de espécies de *Ralstonia*, esse trabalho teve como objetivo avaliar a espécie *Coffea arabica* como um possível hospedeiro deste grupo de patógenos. Três cultivares de *C. arabica* (Catuaí, Catuaí vermelho e Catuaí amarelo) foram inoculadas com nove isolados do complexo de espécies de *Ralstonia*. As plantas de tomateiro suscetível ‘San Vito’ (usadas com controle suscetível) murcharam rapidamente, enquanto que as plantas de cafeeiro levaram até 2 semanas para iniciar a expressão de sintomas. Os sintomas não foram somente de murcha verde, uma vez que ocorreu necrose de folhas cotiledonares, nanismo, perda de brilho e turgidez de folhas mais velhas além de necrose das mesmas. Somente um subgrupo de isolados da espécie *R. pseudosolanacearum* (raça 1/biovar 3/filotipo I) foram capazes de induzir sintomas no cafeeiro. A capacidade desses isolados em infectar o cafeeiro levanta a espécie *R. pseudosolanacearum* como possível ameaça à cultura do cafeeiro no Brasil.

**Palavras-chave:** café, *Ralstonia pseudosolanacearum*, suscetível, patogenicidade.

**Characterization of coffee (*Coffea arabica* – family Rubiaceae) as a host of *Ralstonia pseudosolanacearum* phylotype I isolates**

**ABSTRACT**

The *Ralstonia solanacearum* species complex presents a wide range of hosts, capable of infecting over 250 species in 54 botanic families with frequent new reports of new hosts or new strains infecting already reported hosts. Phylogenetic similarities were observed between the genomes of Rubiaceae and Solanaceae families, including genome size, chromosomal organization and genomic architecture. Due to the close relationship of both botanic families in association with the large number of solanaceous species that are hosts of the *Ralstonia* species complex, this chapter had as an objective to explore the potential of *Coffea arabica* as a host of this group of pathogens. Three cultivars of *C. arabica* (Catuaí, Catuaí vermelho, and Catuaí amarelo) were inoculated with nine isolates from the *R. solanacearum* species complex. The susceptible tomato plants ‘San Vito’ (used as susceptible control) displayed wilting symptoms in a short period of time, while coffee plants took two weeks to initiate symptom expression. The symptoms in *C. arabica* were not only the usual wilt but also necrosis of cotyledonal leaves, dwarfism, and dull green color on the upper surface of older leaves associated with partial leaf necrosis (similar to that induced by water stress). Only a subgroup of *R. pseudosolanacearum* (race 1/biovar 3/phylotype I) isolates were capable of inducing symptoms on coffee plants. The capacity of those isolates on infecting coffee indicates that *R. pseudosolanacearum* might be a possible threat for the coffee crop under Brazilian conditions.

**Keywords:** coffee, host range, *Ralstonia pseudosolanacearum* and pathogenicity.

## 1. INTRODUÇÃO

O cafeeiro (*Coffea arabica* e *C. canephora* – família Rubiaceae) é uma importante ‘commodity’ no Brasil. Segundo o MAPA (2016) (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), o país tem uma área cultivada de 2,25 milhões hectares e 287 mil produtores distribuídos em 15 Estados. Em 2015 o Brasil manteve sua posição como maior produtor e exportador de café do mundo, considerado o segundo maior consumidor. O café arábica (*C. arabica*) é cultivado principalmente sob temperaturas mais amenas, com média entre 19°C – 22°C e em 2015 alcançou a produção de 32,05 milhões de sacas, superior aos 11,19 milhões de café conilon (*C. canephora*), geralmente cultivado em regiões mais quentes com temperatura média entre 22°C – 26°C (Nunes *et al.*, 2005; Ricci & Neves, 2006; MAPA, 2016).

Diversas doenças de etiologia fúngica têm sido descritas afetando o cafeeiro no Brasil como, por exemplo, a ferrugem, cercosporiose, mancha-de-phoma, mancha-de-ascochyta, mancha aureolada, rizoctoniose, roseliniose, mancha anular e amarelinho (Carvalho & Chalfoun, 2000). Entre os patógenos bacterianos, pode-se citar *Burkholderia andropogonis*, agente causal da doença ‘mancha foliar’ (Gonzalez *et al.*, 2007) e *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (Rodrigues *et al.*, 2015).

O que atualmente é conhecido como complexo de espécies de *Ralstonia* (CER) foi inicialmente dividido em raças (Buddenhagen *et al.*, 1962), biovares (Hayward, 1991), filotipos e sequevares (Fegan & Prior, 2005). No Brasil são encontradas as espécies *R. solanacearum*, previamente conhecida como os isolados de filotipo II e *R. pseudosolanacearum* que corresponde aos filotipos I e III, (Santiago *et al.*, 2016). Até o presente momento, apenas isolados do filotipo I têm sido relatados no país (Rodrigues *et al.*, 2011; Santiago *et al.*, 2016). Esse complexo de espécies existe em regiões tropicais e subtropicais, com dispersão por todos os estados brasileiros (Elphinstone, 2005; Lopes, 2005) e elevado risco para produtores de diferentes espécies hospedeiras já relatadas.

O CER apresenta uma ampla gama plantas de hospedeiras, infectando mais de 250 espécies em 54 famílias botânicas (Prior *et al.*, 2016). Novos relatos de plantas hospedeiras são frequentes na literatura como, por exemplo, os registros de doenças em espécies ornamentais (Weibel *et al.* (2016), rúcula (Albuquerque *et al.*, 2016) e figo (Jiang *et al.* (2016), causadas por membros do complexo, demonstrando o potencial infectivo desse complexo (Genin, 2010).

As espécies hospedeiras mais conhecidas do CER pertencem à família Solanaceae, como o tomate, batata, pimentas (*Capsicum*) e berinjela (Elphinstone, 2005). Existe também um grupo de hospedeiras “não tradicionais” que foram relatadas no Brasil, tais como: eucalipto (*Eucalyptus* spp.), rúcula (*Eruca sativa*), abóbora (*Cucurbita* spp.), pepino (*Cucumis sativus*), feijão (*Phaseolus vulgaris*), cariru, maracujá (*Passiflora edulis*) e pimenta longa (*Piper hispidinervium*) (Akiba *et al.*, 1980; Dristig *et al.*, 1988; Parente *et al.*, 1988; Lopes *et al.*, 1997; Lopes *et al.*, 1999; Lopes *et al.*, 2001; Sinigaglia *et al.*, 2001; Malavolta *et al.*, 2008; Albuquerque *et al.*, 2016).

Até o momento poucas rubiáceas foram relatadas como suscetíveis ao patógeno, com registros se limitando a plantas invasoras como *Oldenlandia corymbosa* na Índia (Hayward, 1994) e a *Borreria alata* na Colômbia (Romo, 2012). No Brasil ainda não existem relatos de infecções pelo CER em rubiáceas (Malavolta *et al.*, 2008).

Em um estudo realizado por Lin *et al.* (2005), foi observado uma similaridade filogenética entre as famílias Rubiaceae e Solanaceae, com evidências de que o tomate e o café possam ter divergido entre 83 e 89 milhões de anos atrás (Guyot *et al.*, 2012). Entre as evidências, encontra-se um conjunto de similaridades entre as duas espécies, como tamanho de genoma, organização cromossomal e arquitetura genômica. A partir dessas observações de estreito relacionamento filogenético de tomateiro e do cafeeiro, uma hipótese plausível seria que o processo co-evolutivo da potencial interação *Coffea-Ralstonia*, embora ainda não relatado em condições

naturais, pode ter sido estabelecido antes mesmo das divergências evolucionárias entre as famílias Rubiaceae e Solanaceae. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi explorar a espécie *C. arabica* como possível hospedeira do CER e verificar a potencial ameaça da murcha bacteriana para o cultivo e para a indústria cafeeira do Brasil e do mundo.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Três cultivares de *C. arabica* ('Catucaí', 'Catuaí Amarelo' e 'Catuaí Vermelho') foram selecionadas e propagadas via sementes em bandejas de poliestireno de 72 células preenchidas com substrato esterilizado. As plântulas de café foram mantidas em casa de vegetação até a germinação e formação das folhas cotiledonares, quando foi feita a inoculação (**Figura 12**). Plantas de tomateiro suscetível ('San Vito') foram propagadas por semente em bandeja de 128 células com substrato esterilizado e mantidas em casa de vegetação até o momento da inoculação quando a planta tinha três folhas verdadeiras.



**Figura 12.** Plântulas de *Coffea arabica* em estágio de inoculação (com folhas cotiledonares) imersas em suspensão bacteriana de um isolado do complexo de espécies de *Ralstonia*. Foto: C. A. Lopes.



Nove isolados do CER com diferentes origens geográficas e de diferentes hospedeiros (**Tabela 13**) foram selecionados para inoculação nas mudas de cafeeiro. Os isolados foram cultivados em meio CPG com modificações, substituindo a sacarose pelo glicerol, e mantidos em câmara de crescimento por 48 horas a 28°C. Colônias típicas foram repicadas para outras placas e mantidas pelo mesmo período em câmara de crescimento. O inóculo foi produzido pela raspagem das colônias das placas com meio, suspensas em água comum, homogeneizadas e calibradas por espectrofotômetro para a concentração de  $10^8$  UFC/mL.

Para a inoculação, as plantas foram removidas das bandejas, o substrato removido do sistema radicular por lavagem das raízes, o terço inferior da raiz foi cortado e então imerso em suspensão bacteriana de cada isolado por 1 minuto. Após a inoculação as plantas foram transplantadas para vasos de plástico de 1 L com solo autoclavado e mantidas em casa de vegetação com temperatura entre 20 e 40°C e com aquecimento suplementar noturno, visando minimizar a frequência de escapes. Foram inoculadas 10 plantas de cafeeiro por cultivar por isolado, 10 plantas de tomateiro por isolado e, como controle das condições ambientais, 10 plantas de cafeeiro e 10 de tomateiro foram “inoculadas” apenas com água. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com duas repetições de cinco plantas por cultivar por isolado.

O método de avaliação utilizado foi de contagem de plantas murchas e uma média foi gerada para cada cultivar/isolado. Outros sintomas também foram avaliados devido ao não conhecimento de respostas que possam ser geradas pela infecção por isolados do CER nesta hospedeira.

### **3. RESULTADOS**

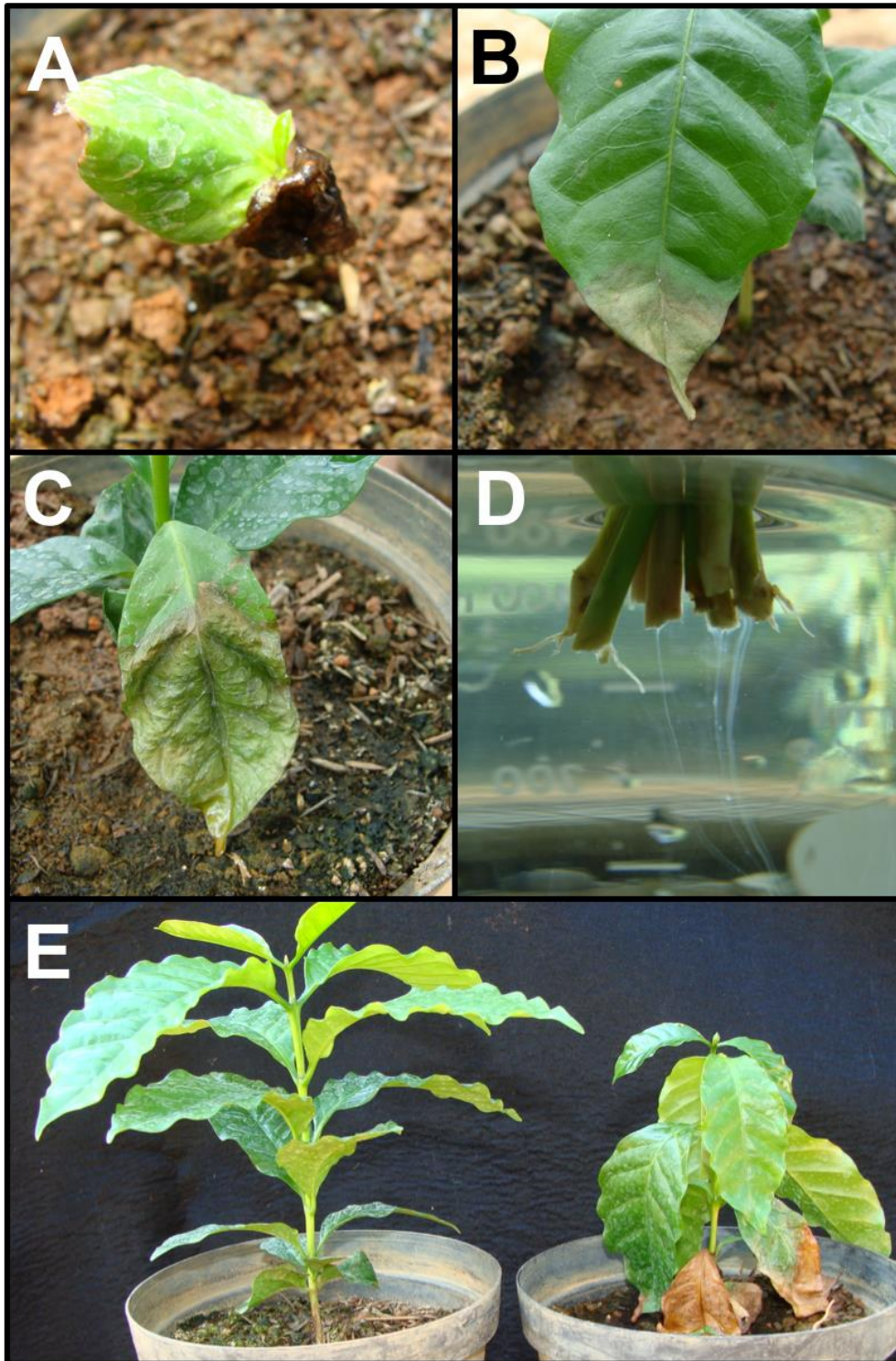
As plantas de tomateiro ‘San Vito’ (controle suscetível) murcharam rapidamente, confirmando a virulência de todos isolados. Nenhuma planta do controle negativo (água)

apresentou qualquer tipo de sintomas. As condições ambientais também foram favoráveis para o desenvolvimento da doença. Alguns dos sintomas observados nas plantas de café foram diferentes daqueles encontrados no tomateiro (caracterizados pela típica presença de ‘murcha verde’) (**Figura 13**). Os seguintes sintomas foram observados em plantas de cafeeiro: **(1)** murcha e seca de uma ou ambas folhas cotiledonares, com morte das plantas no segundo caso; **(2)** perda de turgidez, com perda de brilho na face adaxial foliar; **(3)** epinastia, redução do crescimento sem murcha aparente. Duas semanas após a inoculação, 40 a 67% das plantas de café apresentaram sintomas quando inoculadas com os isolados CNPH-RS 322, CNPH-RS 359 e CNPH-RS 376, todos pertencentes ao filotipo I, atualmente classificados como *R. pseudosolanacearum* (**Tabela 13**).

As plantas sintomáticas foram avaliadas quanto a exsudação de fluxo bacteriano, apresentando grande volume do mesmo. A partir do fluxo bacteriano foi feito o isolamento e bactérias brancas de aparência típica de isolados do CER foram obtidas. Em seguida foram inoculadas em plantas de tomateiro ‘San Vito’ que então apresentaram sintomas claros de murcha. Os isolados foram mais agressivos nas plantas de tomate, induzindo sintomas em cinco dias comparados aos 15 que levou para o café. A cultivar ‘Catuaí’ apresentou sintomas mais rapidamente que a ‘Catuaí Amarelo’ e ‘Catuaí Vermelho’

**Tabela 13.** Porcentagem de plantas murchas de *Coffea arabica* ‘Catucaí’, ‘Catuaí Amarelo’ e ‘Catuaí Vermelho’ (média das três cultivares) e de plantas de tomateiro ‘San Vito’ inoculados por imersão de raízes podadas em suspensão bacteriana de nove diferentes isolados de origens e hospedeiras diferentes.

<b>Isolado</b>	<b>Biovar/ Filotipo</b>	<b>Hospedeira original</b>	<b>Cidade-Estado</b>	<b>Café (%)<sup>3</sup></b>	<b>Tomate (%)</b>
CNPH-RS 210	1/II	Banana	Manaus – Amazonas	0	0
CNPH-RS 217	1/II	Chicória	Santa Isabel – Pará	0	100
CNPH-RS 221	1/II	Tomate	Brasília – Distrito Federal	0	100
CNPH-RS 252	2/II	Batata	Contenda – Paraná	0	20
CNPH-RS 265	1/II	Eucalipto	Eunápolis – Bahia	0	80
CNPH-RS 322	3/I	Tomate	Fortaleza do Tabocão – Tocantins	67	100
CNPH-RS 329	3/I	Jiló	Matinha –Tocantins	0	100
CNPH-RS 359	3/I	Berinjela	Gurupi – Tocantins	53	100
CNPH-RS 376	3/I	Tomate	Sinop – Mato Grosso	40	100



**Figura 13.** Sintomas de murcha bacteriana em plantas de cafeeiro *Coffea arabica*. (A) Necrose de uma das folhas cotiledonares; (B) Perda de turgidez e brilho da face adaxial foliar; (C) Evolução da perda de turgidez seguido de início de necrose da folha; (D) Fluxo bacteriano exsudando de caules seccionados de plantas de cafeeiro infectadas e sintomáticas; (E) À esquerda uma planta não inoculada e à direita planta inoculada com isolado do complexo de

espécies de *Ralstonia* apresentando sintomas de murcha verde também com necrose em folhas mais velhas. Fotos: C. A. Lopes.

#### 4. DISCUSSÃO

Os tipos de sintomas encontrados, como necrose de bordos foliares e perda do brilho da face adaxial indicam sintomas de estresse hídrico, foram condizentes com o efeito físico de entupimento de vasos, induzido pelas colônias da bactéria (Huang & Allen, 2000; Tans-Kersten *et al.*, 2001). Além dos sintomas, as plantas apresentaram o fluxo bacteriano na realização do teste do copo, demonstrando a colonização dos vasos pela bactéria. Seis dos isolados não causaram sintomas em café, cinco deles do filotipo II, sendo um deles da raça 2 (banana) e os demais de variadas hospedeiras. Isolados da raça 2 são mais limitados na sua gama de hospedeiras.

Os isolados que causaram infecções em plântulas de café foram identificados exclusivamente como pertencentes ao filotipo I, atualmente *R. pseudosolanacearum* (Safni *et al.*, 2014). Esse filotipo apresenta as maiores taxas evolutivas e a mais ampla distribuição geográfica (Lebeau *et al.*, 2011; Wicker *et al.*, 2012). Esses resultados levantam a possibilidade não de uma capacidade de causar infecção no cafeeiro do tipo filotipo-específica, mas do tipo isolado-específica, corroborando informações recentes de que seis de dez isolados do filotipo I causaram sintomas de murcha em acessos de café (dados não publicados).

O baixo número de plantas utilizadas nos ensaios impossibilita a inferência de níveis de resistência ou tolerância das cultivares. Em relação à comparação entre espécies de cafeeiro, trabalhos preliminares realizados pelo nosso grupo de pesquisa (dados não publicados) mostraram que acessos de *C. canephora* apresentam uma resposta similar de suscetibilidade à murcha bacteriana. *Coffea canephora* é uma espécie mais adaptada a temperaturas mais

elevadas, o que permite inferir um maior risco dessa espécie sofrer, de maneira mais severa, perdas pela bactéria.

De acordo com o conceito de Kelman (1953), espécie hospedeira é aquela que apresenta sintomas de murcha em condições de campo e os mesmos sintomas devem ser reproduzidos em ensaios, usando inoculação artificial após isolamento do patógeno. Entretanto, para Alvarez *et al.* (2008), verdadeiras hospedeiras do CER devem permitir a colonização dos vasos do xilema e as espécies tolerantes seriam aquelas em que poucos ou ocasionais vasos são colonizados. Como até o momento não foram observados sintomas em cafeeiro no campo, segundo Kelman, o cafeeiro ainda seria uma espécie alternativa, podendo, por exemplo, ser empregada na rotação de culturas com espécies suscetíveis. Porém, com base nos resultados apresentados, tal rotação poderia levar ao aumento da população bacteriana e conseqüente pressão de seleção a favor de isolados capazes de infectar o cafeeiro. Mesmo aplicando o conceito de “tolerante” dado por Alvarez *et al.* (2008), o cafeeiro serviria como um potencial disseminador do patógeno, por meio de infecções latentes por viveiros de mudas contaminadas, similar ao ocorrido em algumas áreas de cultivo com eucalipto (Alfenas *et al.*, 2009).

Confirmado a capacidade de *R. pseudosolanacearum* em causar murcha em mudas de cafeeiro, surge a necessidade de testes que visem a diagnose precoce, para evitar a disseminação do patógeno em áreas de cultivos dessa potencial hospedeira. Os sintomas similares aos de estresse hídrico podem levar a um diagnóstico equivocado, o que pode atrasar o estabelecimento de práticas de manejo que evitem potenciais perdas na cultura. Por ser uma doença vascular, os sistemas de diagnose frequentemente levam a destruição da amostra, como no caso do teste do copo ou outros que necessitem do sistema vascular central.

O aquecimento global é um assunto constante nos dias de hoje e suas conseqüências surgem mais fortemente a cada ano. Esse fenômeno eventualmente atingirá regiões produtoras

de café, levando novos patógenos de clima tropical a afetar essa cultura, ou por adaptação ou simplesmente por fornecer melhor ambiente para o desenvolvimento dos mesmos.

Com modificações nas temperaturas mundiais citadas anteriormente, o CER poderá se tornar um problema em novas regiões onde previamente não podia se estabelecer, em especial, devido a sua temperatura ideal para sobrevivência e multiplicação entre 27°C a 35°C (Hayward, 1991). Para reduzir os riscos de perdas pelas mudanças climáticas, Savary *et al.* (2011) indicam a necessidade de antecipar o estabelecimento de potenciais epidemias. La Porta *et al.* (2008) destacam também a importância de identificar patógenos de elevado potencial destrutivo, tendo como objetivo alertar as autoridades e a sociedade científica sobre os riscos de eventuais epidemias.

Até o momento esse é o primeiro relato de infecção artificial do cafeeiro por *R. pseudosolanacearum*, expandindo a gama de hospedeiras desse patógeno. Mais recentemente, comparações genéticas de distintos isolados do CER indicaram que o grupo de genes envolvidos na gama de hospedeiras e virulência está evoluindo mais rapidamente que o genoma da bactéria como um todo (Remenant *et al.*, 2010).

O presente trabalho evidencia o cafeeiro como um dos hospedeiros de *R. pseudosolanacearum* (filotipo I – biovar 3), podendo trazer uma ameaça em potencial para essa importante cultura e para o agronegócio do café, em especial em novas fronteiras geográficas que possam apresentar condições ambientais favoráveis a epidemias naturais. O melhoramento do cafeeiro tem entre suas linhas, o desenvolvimento de materiais genéticos com maior capacidade de produção em temperaturas mais elevadas, sendo recomendado também a busca por possíveis fontes de resistências a fitopatógenos de clima tropical, incluindo *R. pseudosolanacearum*.

## 5. CONCLUSÕES

- O cafeeiro (*C. arabica*), é hospedeiro de *R. pseudosolanacearum* (filotipo I – biovar 3);
- Apenas isolados de *R. pseudosolanacearum* (filotipo I – biovar 3) foram capazes de infectar plântulas de cafeeiro, induzindo sintomas;
- O aparecimento de sintomas no cafeeiro é mais lento e sutil (nanismo e seca de folhas) do que aqueles observados em tomateiro, que é um hospedeiro natural de *R. pseudosolanacearum* (filotipo I – biovar 3);
- A ausência de sintomas típicos de murcha pode levar a equívoca diagnose da causa, reduzindo a possibilidade de controle do patógeno;
- Devido ao plantio do cafeeiro geralmente ocorrer em regiões de clima mais frio, possivelmente haja escape da infecção por *R. pseudosolanacearum* (filotipo I – biovar 3), porém, espécies de cafeeiro mais adaptadas a altas temperaturas (ex. *C. canephora*) poderão permitir o desenvolvimento de epidemias de murcha;
- A migração da cultura do cafeeiro rumo à Região Norte do país e o fenômeno de aquecimento global indicam que os programas de melhoramento genético da cultura devem levar em consideração a possível ameaça que venha representar a *R. pseudosolanacearum* (filotipo I – biovar 3) para a cafeicultura nacional.

## 6. PERSPECTIVAS

- Avançar na busca por variedades resistentes de *C. canephora* e *C. arabica*, visando estabelecimento de uma base genética para resistência a murcha bacteriana;
- Analisar geneticamente os isolados quanto à capacidade de infectar o cafeeiro, para identificar quais características genéticas estariam vinculadas a esse atributo;
- Procurar, em condições de campo plantas de cafeeiro com sintomas de murcha bacteriana similares aos induzidos nas condições experimentais empregadas no presente trabalho.



## 7.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKIBA, F.; KIMURA, O.; PIMENTEL, J.P.; RIBEIRO, R.L.D. & ROBBS, C.F. 1980. Murcha bacteriana do feijão vagem: doença nova para o Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 6:379.
- ALBUQUERQUE, G.M.R.; SILVA, A.M.F.; SILVA, J.R.; SOUZA, E.B.; GAMA, M.A.S. & MARIANO, R.L.R. 2016. First Report of Bacterial Wilt Caused by *Ralstonia pseudosolanacearum* on *Eruca vesicaria* subsp. *sativa* in Brazil. *Plant Disease* 100:2319.
- ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.F.; MAFIA, R.G. & ASSIS, T.F. 2009. Clonagem e doenças de eucalipto. 2 Ed. Editora UFV. Viçosa, MG.
- ALVAREZ, B.; VASSE, J.; LE-COURTOIS, V.; TRIGALET-DÉMERY, D.; LÓPEZ, M.M. & TRIGALET, A. 2008. Comparative behavior of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 in diverse plant species. *Phytopathology* 98:59-68.
- BUDDENHAGEN, I.W.; SEQUEIRA, L. & KELMAN, A. 1962. Designation of races of *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 52:726-730.
- CARVALHO, V.L.D. & CHALFOUN, S.M. 2000. Doenças do cafeeiro: diagnose e controle. 1 Ed. EPAMIG. Belo Horizonte.
- DRISTIG, M.C.G.; DIANESE, J.C. & TAKATSU, A. 1988. Characterization of *Pseudomonas solanacearum* isolated from *Eucalyptus*. *Fitopatologia Brasileira* 13:106-108.
- ELPHINSTONE, J.G. 2005. 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*. 1 ed. APS Press. Estados Unidos. p. 9-28.
- FEGAN, M. & PRIOR, P. 2005. 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*. 1 ed. APS Press. Estados Unidos. p. 449-461.
- GENIN, S. 2010. Molecular traits controlling host range and adaptation to plants in *Ralstonia solanacearum*. *New Phytologist* 187:920-928.
- GONZALEZ, C.F.; VENTURI, V. & ENGLEDDOW, A.S. 2007. The phytopathogenic *Burkholderia*. In: COENYE, T. & VANDAMME, P. eds. *Burkholderia: Molecular Microbiology and Genomics*. 1 ed. Horizon Scientific Press. Reino Unido. p. 153-176.
- GUYOT, R.; LEFEBVRE-PAUTIGNY, F.; TRANCHANT-DUBREUIL, C.; RIGOREAU, M.; HAMON, P.; LEROY, T.; HAMON, S.; PONCET, V.; CROUZILLAT, D. & DE KOCHKO, A. 2012. Ancestral synteny shared between distantly-related plant species from the asterid (*Coffea canephora* and *Solanum* sp.) and rosid (*Vitis vinifera*) clades. *BMC Genomics* 13:1-13.

- HAYWARD, A.C. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annual Review of Phytopathology 29:65-87.
- HAYWARD, A.C. 1994. The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. In: HAYWARD, A.C. & HARTMAN, G.L. eds. *Pseudomonas solanacearum: The disease and its causative agent*. 1 ed. CABI International. Reino Unido. p. 101-115.
- HUANG, Q. & ALLEN, C. 2000. Polygalacturonases are required for rapid colonization and full virulence of *Ralstonia solanacearum* on tomato plants. Physiological and Molecular Plant Pathology 57:77-83.
- JIANG, Y.; LI, B.; LIU, P.; LIAO, F.; WENG, Q. & CHEN, Q. 2016. First report of bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* on fig trees in China. Forest Pathology 46:256-258.
- KELMAN, A. 1953. The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. In. Raleigh: North Carolina Agricultural Experiment Station, 194.
- LA PORTA, N.; CAPRETTI, P.; THOMSEN, I.M.; KASANEN, R.; HIETALA, A.M. & VON WEISSENBERG, K. 2008. Forest pathogens with higher damage potential due to climate change in Europe. Canadian Journal of Plant Pathology 30:177-195.
- LEBEAU, A.; DAUNAY, M.-C.; FRARY, A.; PALLOIX, A.; WANG, J.-F.; DINTINGER, J.; CHIROLEU, F.; WICKER, E. & PRIOR, P. 2011. Bacterial wilt resistance in tomato, pepper, and eggplant: genetic resources respond to diverse strains in the *Ralstonia solanacearum* species complex. Phytopathology 101:154-165.
- LIN, C.; MUELLER, L.A.; MC CARTHY, J.; CROUZILLAT, D.; PETIARD, V. & TANKSLEY, S.D. 2005. Coffee and tomato share common gene repertoires as revealed by deep sequencing of seed and cherry transcripts. Theoretical and Applied Genetics 112:114-130.
- LOPES, C.A. 2005. Murchadeira da batata. 1 Ed. Associação Brasileira da Batata. Itapetininga.
- LOPES, C.A.; POLTRONIERI, L.S.; ALBUQUERQUE, F.C. & TRINDADE, D.R. 1997. A murcha bacteriana em pimenta longa. Horticultura Brasileira resumo 140.
- LOPES, C.A.; POLTRONIERI, L.S. & POLTRONIERI, M.C. 2001. Cariru, nova hospedeira de *Ralstonia solanacearum*. Horticultura Brasileira Resumo 19.
- LOPES, C.A.; POLTRONIERI, L.S.; QUEZADO-SOARES, A.M.; TRINDADE, D.R. & ALBUQUERQUE, F.C. 1999. Maracujazeiro, mais um hospedeiro de *Ralstonia solanacearum*. Summa Phytopathologica 25.
- MALAVOLTA, J.; BERIAM, L.; ALMEIDA, I.; RODRIGUES NETO, J. & ROBBS, C. 2008. Bactérias fitopatogênicas assinaladas no Brasil: uma atualização. Summa Phytopathologica 34:9-87.

- MAPA 2016. O cafeeiro no Brasil [<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cafe/saiba-mais>] Consultado em 05/07/2016.
- NUNES, A.M.L.; SOUZA, F.F.; COSTA, J.N.M.; SANTOS, J.C.F.; PEQUENO, P.L.; COSTA, R.S.C. & VENEZIANO, W. 2005. Cultivo do Café Robusta em Rondônia. Sistemas de Produção 5 [<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/>] Consultado em 05/05/2016.
- PARENTE, P.M.G.; TAKATSU, A. & LOPES, C.A. 1988. Ocorrência de *Pseudomonas solanacearum* em pepino. Horticultura Brasileira Resumo 25.
- PRIOR, P.; AILLOUD, F.; DALSING, B.L.; REMENANT, B.; SANCHEZ, B. & ALLEN, C. 2016. Genomic and proteomic evidence supporting the division of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* into three species. BMC Genomics 17:90-101.
- REMENANT, B.; COUPAT-GOUTALAND, B.; GUIDOT, A.; CELLIER, G.; WICKER, E.; ALLEN, C.; FEGAN, M.; PRUVOST, O.; ELBAZ, M. & CALTEAU, A. 2010. Genomes of three tomato pathogens within the *Ralstonia solanacearum* species complex reveal significant evolutionary divergence. BMC Genomics 11:379-395.
- RICCI, M.S.F. & NEVES, M. 2006. Cultivo do Café Orgânico [[http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Cafe/CafeOrganico\\_2ed/index.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Cafe/CafeOrganico_2ed/index.htm). ] Consultado em 02/05/2016.
- RODRIGUES, L.M.R.; DESTÉFANO, S.A.L.; DINIZ, M.C.T.; R., C. & RODRIGUES NETO, J. 2011. Pathogenicity of Brazilian strains of *Ralstonia solanacearum* in *Strelitzia reginae* seedlings. Tropical Plant Pathology 36:409-413.
- RODRIGUES, L.M.R.; QUEIROZ-VOLTAN, R.B. & GUERREIRO FILHO, O. 2015. Anatomical changes on coffee leaves infected by *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. Summa Phytopathologica 41:256-261.
- ROMO, J.P. 2012. Identification of new hosts for *Ralstonia solanacearum* (Smith) race 2 from Colombia. Revista de Protección Vegetal 27:151-161.
- SAFNI, I.; CLEENWERCK, I.; DE VOS, P.; FEGAN, M.; SLY, L. & KAPPLER, U. 2014. Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. and *R. solanacearum* phylotype I and III strains as *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 64:3087-3103.
- SANTIAGO, T.R.; LOPES, C.A.; CAETANO-ANOLLÉS, G. & MIZUBUTI, E.S.G. 2016. Phylotype and sequevar variability of *Ralstonia solanacearum* in Brazil, an ancient center of diversity of the pathogen. Plant Pathology.

- SAVARY, S.; NELSON, A.; SPARKS, A.H.; WILLOCQUET, L.; DUVEILLER, E.; MAHUKU, G.; FORBES, G.; GARRETT, K.A.; HODSON, D. & PADGHAM, J. 2011. International agricultural research tackling the effects of global and climate changes on plant diseases in the developing world. *Plant Disease* 95:1204-1216.
- SINIGAGLIA, C.; LOPES, M.; ALMEIDA, I.M.G. & RODRIGUES NETO, J. 2001. Bacterial wilt of summer squash (*Cucurbita pepo*) caused by *Ralstonia solanacearum* in the State of São Paulo, Brazil. *Summa Phytopathologica* 27:251-253.
- TANS-KERSTEN, J.; HUANG, H. & ALLEN, C. 2001. *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. *Journal of bacteriology* 183:3597-3605.
- WEIBEL, J.; TRAN, T.M. & BOCSANCZY, A.M. 2016. A *Ralstonia solanacearum* Strain from Guatemala Infects Diverse Flower Crops, Including New Asymptomatic Hosts Vinca and Sutera, and Causes Symptoms in Geranium, Mandevilla Vine, and New Host African Daisy (*Osteospermum ecklonis*). *Plant Health Progress* 17:114.
- WICKER, E.; LEFEUVRE, P.; DE CAMBIAIRE, J.-C.; LEMAIRE, C.; POUSSIER, S. & PRIOR, P. 2012. Contrasting recombination patterns and demographic histories of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from MLSA. *The ISME Journal* 6:961-974.

# CONCLUSÕES GERAIS

---

---

- O isolado CNPH-RS 488 *Ralstonia solanacearum*, capaz de suplantar a resistência da linhagem ‘Hawaii 7996’ é mais agressivo e apresenta capacidade de murchar também as espécies berinjela e jiló. Não sendo possível explicar tal capacidade por meio da quantificação de exopolissacarídeo ou biofilme;
- O meio semi-seletivo SMART limitou o crescimento de isolados brasileiros das biovars 1, 2A e 2T do complexo de espécies de *Ralstonia*, não sendo recomendado seu uso para isolamento de isolados desse complexo;
- A estratégia de *bulk segregant analysis* associado com o desenho de *primers* SCAR e o sistema de marcadores RAPD permitiu a identificação de um conjunto de *primers* informativos para as biovars 1 e 2A do complexo de espécies de *Ralstonia*;
- A estratégia de subtração *in silico* usando genomas completos de isolados do complexo de espécies de *Ralstonia* permitiu o desenvolvimento de um par de *primers* específico para o gene sorbitol desidrogenase (*polS*) , que, no presente estudo, está presente somente nos isolados de biovar 3.
- Um subgrupo de genótipos de *Solanum peruvianum* apresentou potencial para uso em programas de melhoramento do tomateiro visando resistência à murcha bacteriana devido à sua resistência superior que a linhagem resistente ‘Hawaii 7996’.
- O cafeeiro (*C. arabica*), quando artificialmente inoculado em casa de vegetação, se mostrou ser hospedeiro apenas de isolados de *R. pseudosolanacearum*.