

MAURÍCIO ROSSATO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE  
EM GERÂNIO DE ISOLADOS BRASILEIROS DA BIOVAR 2 DE *Ralstonia  
solanacearum***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2012

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

R823c  
2012

Rossato, Maurício, 1988-

Caracterização molecular e avaliação da patogenicidade em  
gerânio de isolados brasileiros da biovar 2 de  
*Ralstonia solanacearum* / Maurício Rossato. – Viçosa, MG,  
2012.

viii, 46f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Carlos Alberto Lopes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 38-46

1. Gerânio - Doenças e pragas. 2. *Ralstonia solanacearum*.  
3. *Pelargonium*. 4. Fitopatologia. 5. Bactérias  
fitopatogênicas. 6. Bacteriologia - Classificação.  
7. Diagnóstico molecular. 8. Plantas ornamentais.  
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 635.93379

MAURÍCIO ROSSATO


**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE  
EM GERÂNIO DE ISOLADOS BRASILEIROS DA BIOVAR 2 DE *Ralstonia  
solanacearum***


Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 10 de fevereiro de 2012

  
José Antônio Saraiva Grossi

  
Luis Cláudio Vieira Cunha

  
José Rogério de Oliveira  
(Coorientador)

  
Carlos Alberto Lopes  
(Orientador)

Dedico este trabalho à minha família,  
meus amigos e a todos que me ajudaram  
neste percurso

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por me iluminar nos momentos difíceis

Aos meus pais, pelo incentivo.

Ao Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos de Mestrado.

Ao meu orientador Dr. Carlos Alberto Lopes pela paciência, disposição de ajudar e pelos conselhos, acompanhando-me ao longo de toda minha vida acadêmica.

Ao meu co-orientador José Rogério de Oliveira, por estar sempre disposto a esclarecer qualquer dúvida sempre que solicitado e pela acolhida no momento do meu ingresso na UFV.

Ao prof. Eduardo Seiti Gomide Mizubuti pela ajuda e por oferecer a infraestrutura de seu laboratório.

Aos colegas do Laboratório de Bacteriologia, Lívio, Hélivio, Elisângela, Poliana, em especial a Sueli, pela companhia, pelos momentos agradáveis e pela ajuda.

Aos colegas do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Hortaliças, Cecília, Cléia, Edivânio, Fabiana, Higor, Josineide, Larissa, Luana, Maíra, Mélo di, Nadson, Rayane, pela amizade e bons momentos.

Aos amigos que conquistei no mestrado, Patrícia, Adriana, Thais, Bianca, Valéria, Paula, Sílvia, Stefânia, Lívio, Leonardo, Alexandre, André, Diogo, e todos os que acompanharam nesses dois anos de estudo, muito obrigado!

A todos os professores do Departamento de Fitopatologia da UFV, pelos ensinamentos prestados, com muita dedicação e presteza.

À Lazzeri por fornecer as mudas de gerânio utilizadas ao longo dos experimentos.

**Muito Obrigado!**

## SUMÁRIO

RESUMO .....	v
ABSTRACT .....	vii
1. Introdução .....	1
2. Revisão de literatura .....	6
2.1 A doença.....	6
2.2 Taxonomia .....	7
2.3 Diversidade e Classificação .....	7
2.3 Sintomatologia .....	11
2.4 O Gerânio .....	12
2.5 Métodos de detecção.....	13
2.5.1 Isolamento .....	14
2.5.2 Bioensaio.....	14
2.5.3 Imunofluorescência (IF).....	14
2.5.4 ELISA .....	15
2.5.5 Polymerase Chain Reaction (PCR) .....	15
3. Material e Métodos .....	16
3.1 A escolha dos isolados .....	16
3.2 Identificação dos isolados.....	18
3.2.1 Confirmação de espécie de <i>Ralstonia solanacearum</i> .....	18
3.2.2 Determinação da biovar.....	19
3.2.3 Extração de DNA genômico .....	19
3.2.4 Identificação dos filotipos.....	20
3.3 Patogenicidade de isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i> a <i>Pelargonium peltatum</i> e <i>Pelargonium hortorum</i> .....	21
4. Resultados e Discussão .....	25
4.1 Capacidade de infectar <i>Pelargonium</i> sp., batateira e tomateiro.....	25
4.2 Identificação de filotipos.....	34
5. Conclusões .....	38
6. Referências Bibliográficas.....	38

## RESUMO

ROSSATO, Maurício, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2012. **Caracterização molecular e avaliação da patogenicidade em gerânio de isolados brasileiros da biovar 2 de *Ralstonia solanacearum***. Orientador: Carlos Alberto Lopes. Coorientadores: José Rogério de Oliveira e Eduardo Seiti Gomide Mizubuti.

*Ralstonia solanacearum* (RS) é uma espécie bacteriana complexa que causa a murcha bacteriana em centenas de plantas hospedeiras, provocando grandes perdas principalmente em solanáceas cultivadas em países de clima tropical e subtropical. Especificamente a raça 3 biovar 2 (R3B2) do patógeno, além de causar perdas diretas, causa infecções latentes em diversas hospedeiras, como o *Pelargonium* sp., o que facilita sua disseminação dentro e entre países. Por exemplo, na última década, esta bactéria foi introduzida nos EUA desta forma, causando preocupação em virtude da adaptação dessa variante à cultura da batata. Face à sua forte restrição quarentenária principalmente em países da América do Norte, onde adquiriu status de agente de bioterrorismo, avaliou-se a patogenicidade a gerânio de 36 isolados brasileiros, com ênfase na R3B2 de RS. Esses isolados foram avaliados quanto à sua capacidade de infectar gerânios (*P. peltatum*, *P. hortorum*), batata e tomate. Plantas jovens foram inoculadas pela penetração do xilema com um alfinete esterilizado contaminado pelo toque em colônia de RS de cada isolado. Foram usados 36 isolados, sendo 10 da biovar 1, 22 da biovar 2, dois da biovar 3 e dois de gerânio. A incidência da doença foi medida a cada dois dias pela porcentagem de plantas com sintomas da doença. Além do teste de patogenicidade a gerânio, os isolados foram identificados em filotipos com a finalidade de verificar se os isolados capazes de infectar estas hospedeiras se agrupavam de maneira a explicar alguns dos comportamentos. Todas as cinco cultivares de gerânio foram suscetíveis, porém ocorreram variações quanto à resposta entre isolados. Os gerânios, em geral, são menos suscetíveis a todos os isolados quando comparados com batata e tomate. Dezenove dos 36 isolados infectaram uma ou duas das espécies testadas e 17 infectaram ao menos uma planta de todas as espécies hospedeiras avaliadas. Isolados das raças 1 e 3,

biovars 1, 2 e 3, filotipos I e II, foram capazes de infectar o gerânio. A capacidade de isolados brasileiros da R3B2 de RS de infectar o gerânio faz com que sejam necessários métodos especiais para identificação e detecção da bactéria em viveiros de plantas visando a exportação. Não foi possível agrupar os isolados segundo suas características patogênicas e moleculares; então, é proposto que análises de genoma completo sejam realizadas para que pequenos deste, possam revelar a gama de hospedeiras.

## ABSTRACT

ROSSATO, Maurício, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2012. **Molecular characterization and pathogenicity evaluation on geranium of Brazilian strains of biovar 2 of *Ralstonia solanacearum*.** Adviser: Carlos Alberto Lopes. Co-Advisers: José Rogério de Oliveira and Eduardo Seiti Gomide Mizubuti.

*Ralstonia solanacearum* (RS) is a bacterial complex species that causes the bacterial wilt in hundreds of plant hosts, inducing heavy losses mainly on cultivated solanaceous species in tropical and subtropical countries. The race 3 biovar 2 (R3B2) of the pathogen causes not only direct losses but latent infections in many hosts, like the geranium, which facilitates its dissemination in and between countries. In the last decade, it was introduced in USA by infected geranium from Kenya and Guatemala, causing great concerns due the adaptation of this variant to the potato crop. In USA, the R3B2 of RS acquired the status of bioterrorism agent and now faces strong quarantine restrictions in the country. In this work we evaluated the pathogenicity of 36 Brazilian RS strains to geranium, most of them of R3B2. These strains were evaluated to their capacity of infecting geranium (*Pelargonium peltatum* and *P. hortorum*), potato and tomato. Seedlings were inoculated by xylem penetration with a pin contaminated at the time of inoculation by touching it onto the selected colony. Ten strains of biovar 1, 22 of biovar 2 and two of biovar 3 were used for comparison purposes. The disease incidence was measured every two days by the percentage of symptomatic plants. The strains were identified in order to analyze the eventual correlations among host of origin, biovar and phylotype. All the five geranium cultivars tested were susceptible, but with different responses among strains. The geraniums were less susceptible than solanaceous hosts tested. Nineteen strains infected one or two of the hosts and 17 infected at least one of the three hosts. The races 1 and 3, biovars 1, 2 and 3, phlotypes I and II, were all capable of infecting geranium. The capacity of R3B2 Brazilian strains to infect the geranium requires special methods for identification and detection of the bacteria in greenhouses for plants produced for export. It was not possible to group the strains according to pathogenic and molecular

characteristics; therefore, it is proposed that complete genome analysis be performed to unveil eventual host specificity for some isolates.

## 1. Introdução

A bactéria *Ralstonia solanacearum*, agente causal da murcha bacteriana, causa perdas significativas e pode sobreviver por longos períodos no solo, dificultando seu controle (Lopes, 2005). Esta espécie afeta mais de 50 famílias botânicas (Hayward, 1994) e sua disseminação a longas distâncias ocorre, principalmente, por material propagativo (Lopes, 2005). Está presente em seis dos sete continentes (Fegan & Prior, 2005) e, somente em batata, causa perdas em torno de 1 bilhão de dólares por ano (APHIS-PPQ, 2006).

*R. solanacearum* é considerada um complexo de espécies, dividida em cinco raças, cinco biovars, quatro filotipos e 51 sequevares. As classificações mais antigas como raças e biovars foram baseadas em fenótipos, como, gama de hospedeiras e capacidade de uso de diferentes fontes de carboidratos respectivamente. Recentemente, novas classificações foram propostas, como os filotipos e sequevares, proposta feita por Fegan & Prior (2005), se baseiam no genoma, estudando as variações da região 16S e dos genes *egl*, *MutS* e outros.

A classificação de raças é baseada na gama de hospedeiras de um determinado isolado, sendo a raça 3 conhecida pela estreita gama de hospedeiras, infectando somente solanáceas em especial a batata. A raça 3 corresponde à biovar 2, por sua vez, é dividida em 2A e 2T (Hayward *et al.*, 1991). Embora a principal hospedeira da raça 3 seja a batata, podendo infectar outras espécies como o gerânio, tomate e berinjela, no caso da biovar 2T. A R3B2 está associada com a capacidade de desenvolver infecções latentes em temperaturas mais baixas que a ideal para a *Ralstonia solanacearum* (Ciampi & Sequeira, 1980). No Brasil, prevalece na batateira em regiões mais frias da região Sul. Somente em Goiás e no Triângulo mineiro a raça predominante é a raça 1, pois esta é nativa dos solos do cerrado (Lopes, 2005). Segundo Garcia (2009), em seu estudo sobre a diversidade de isolados da biovar 2 de batata no Brasil, houve uma predominância da biovar 2T, filotipo II, sequevar I, o que demonstra uma certa uniformidade genética de acordo com a classificação de

Fegan & Prior (2005). Esse é um fator que facilita o desenvolvimento de cultivares resistentes e métodos de detecção.

É estimado que a murcha bacteriana afete 1,5 milhões de hectares em, aproximadamente, 80 países, causando grandes perdas (APHIS-PPQ, 2006). A batata é uma das culturas que vem ganhando mais importância como fonte de alimento, emprego rural e ingressos financeiros, podendo contribuir para a alimentação e a estabilização, principalmente nos países em desenvolvimento. É a quarta cultura na ordem de importância no mundo, sua produção anual é de 300 milhões de toneladas, em uma área cultivada de 20 milhões de hectares, com uma produtividade de 15 toneladas por hectare (Pereira & Daniels, 2003). No Brasil, sua produção, em 2008, chegou a 3.676.938 toneladas, sendo considerado o décimo quinto maior produtor do mundo, e os Estados Unidos é um dos maiores, se enquadrando em terceiro lugar e a China em primeiro (FAO, 2010).

Desde 1958, de acordo com o Decreto Nº 45.104, de 23 de Dezembro de 1958, existe a política de tolerância zero à presença de qualquer variante de *R. solanacearum* nas classes de batata-semente (básica, registrada e certificada), o que reduz a disseminação do patógeno pelo país; entretanto, o uso de sementes certificadas nem sempre é uma prática comum pelos produtores.

Todas as normas aplicadas para evitar a entrada do patógeno em países onde é considerada uma praga quarentenária não apresentam políticas de controle para hospedeiras alternativas que possam transportar o patógeno, em especial em infecções latentes. O gerânio (*Pelargonium* spp.) é também uma hospedeira de *R. solanacearum* R3B2 (Hayward, 1991; Hayward, 1994; Janse, 1996; Ji *et al.*, 2007; Williamson, 2002). Existem relatos desde 1980 de mudas de gerânio agindo como hospedeiras de transporte intercontinental de *R. solanacearum* para países onde esta é ausente.

O gerânio é propagado vegetativamente por estacas de uma planta mãe que, em um período de 6 a 12 meses, pode gerar 20 a 35 estacas com uma média de duas por semana (Swanson *et al.*, 2007). Por facilmente desenvolver

o patógeno de forma assintomática, quando produzido em condições de temperaturas mais baixas que o ideal para a doença (Swanson *et al.*, 2005), a diagnose visual é dificultada e permite a passagem pelas barreiras sanitárias.

O Brasil exporta mudas de gerânio para diversos países do mundo. Por exemplo, a empresa Lazzeri exporta 90% da sua produção para a Itália, onde as mudas são postas para crescer e também para a propagação vegetativas dessas. Os outros 10% da produção são importados pela Alemanha, Espanha, República Tcheca, Polônia e Holanda. Diversas outras empresas que trabalham com exportação se baseiam na propagação por sementes para venda de “plugs”. Isso reduz o risco de infecções latentes que geralmente estão relacionadas com a planta mãe infectada, mas não elimina totalmente o risco, pois o patógeno pode infectar por outras vias como substrato e água contaminados.

A R3B2 de *R. solanacearum*, desde 2002, é considerada pelo Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS) dos EUA como um agente de bioterrorismo (Lambert, 2002), devido à seriedade da introdução desse patógeno em um dos maiores produtores de batata do mundo (Swanson *et al.*, 2005; APHIS-PPQ, 2003). A R3B2 não ocorre nos Estados Unidos, embora haja diversos relatos da entrada do patógeno no país. O primeiro relato nos EUA foi em 1981, em lotes de gerânios contaminados encontrados em 1979 sem fonte de contaminação conhecida, não podendo ser identificada a raça ou biovar desse isolado, pois foi testada somente a capacidade de infectar algumas hospedeiras, e a não capacidade de afetar o tabaco foi uma das características destacadas (Strider, 1981). Em 1995 e 1999 a R3B2 foi encontrada em plantas de gerânio importadas da Guatemala (Hudelson, 1999). Em 2003, novamente a R3B2 foi introduzida nos EUA por plantas de gerânio importadas do Quênia (Smith *et al.*, 2008). Novamente da Guatemala, em 2004, foram importadas pelos EUA plantas de gerânio com infecções latentes, disseminando esta variante do patógeno por 27 estados do país (APHIS-PPQ, 2008). Nesse ano, ocorreu uma das piores disseminações, cobrindo grande parte do país, de forma silenciosa. Todas as entradas, quando identificadas, tiveram uma análise de quais estados foram afetados e vários planos de

controle foram desenvolvidos, resultando em novas leis para regulamentação de entrada de gerânios no país.

Somente na última introdução, mais de 2 milhões de plantas de gerânio, ao custo de 10 milhões de dólares, foram destruídas (APHIS-PPQ, 2008). Todas as vezes, a erradicação da R3B2 do país teve sucesso (Norman *et al.*, 2009), devido à aplicação de um protocolo estabelecido que determina quais procedimentos devem ser seguidos em caso de uma possível detecção em plantas de gerânio ou batata. Esses passos incluem determinar a origem da infecção, aplicar medidas quarentenárias na área, identificar se houve distribuição de material contaminado a partir do viveiro ou produtor e aplicar uma série de testes de solo e do sistema de irrigação (APHIS-PPQ, 2008). Por outro lado, o risco de novos focos da doença aumenta todo ano juntamente com o volume de estacas importadas de países exportadores que, em 2003, chegaram a mais de 100 milhões de estacas por ano (Swanson *et al.*, 2005).

Na mesma época, a União Européia passou por uma situação parecida, com a entrada de plantas de gerânio com infecções latentes provenientes do Quênia (Janse *et al.*, 2004). Em 2000, foram detectados focos da R3B2 em viveiros na Bélgica, Alemanha e Holanda. Medidas quarentenárias foram impostas para evitar a disseminação para países próximos e um protocolo foi desenvolvido para treinar laboratórios na detecção da *R. solanacearum* R3B2. Esse protocolo EPPO (EU protocols, 2006) foi publicado e atualizado desde então (Janse, 1996). Após os incidentes, os viveiros do Quênia, que realizam exportações, passaram a ser monitorados, principalmente quanto à qualidade da água de irrigação, que foi a provável fonte de inóculo dos viveiros (Janse *et al.*, 2004). A União Européia é considerada, em termos de controle de doenças de plantas, como um único país; entretanto, essa característica não é extrapolada para funcionar com a presença da R3B2, já que esta, presente em diversos países, ainda é motivo de bloqueio de diversas importações de material de risco de países com histórico da doença. Na Europa, o primeiro relato é antigo: a introdução da R3B2 via batata semente contaminada ocorreu na Suécia, em 1976, trazendo problemas político-econômicos em 1995, com altos níveis de incidência em campos produtores de batata (Olson, 1976;

Janse, 1996). Após diversas tentativas de eliminação do patógeno, o objetivo não foi alcançado, embora atualmente a doença esteja sob controle, causando poucas perdas (Elphinstone, 2005).

Um maior entendimento, das diferenças genotípicas e fenotípicas, possibilitam que técnicas de detecção e controle direcionadas para evitar a disseminação da R3B2 da *R. solanacearum* para diversos países onde poderia gerar problemas na produção de solanáceas. O presente trabalho teve como objetivo identificar dentre os isolados da coleção de *R. solanacearum* do Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças (CNPq) aqueles capazes de infectar mudas de gerânio e, através de técnicas moleculares, compará-los com isolados incapazes de infectar essa hospedeira. Isso para permitir o desenvolvimento de técnicas de identificação e detecção do patógeno em lotes a serem exportados, reduzindo os riscos que estariam associados à importação de gerânios brasileiros.

Para maior entendimento da variabilidade do patógeno o objetivo específico deste trabalho de identificar as diferenças existentes entre isolados de *Ralstonia solanacearum* da R3B2 capazes de infectar gerânios, pelo uso de testes bioquímicos e moleculares, foram:

1. Realizar um teste de patogenicidade em mudas de gerânio, tomate e batata para verificar quais isolados de *Ralstonia solanacearum* são capazes de infectar *Pelargonium* sp.;
2. Identificar filotipos dos isolados de *Ralstonia solanacearum*, em especial os da R3B2;
3. Avaliar a diferença de resistência entre quatro diferentes variedades de *Pelargonium peltatum*.
4. Analisar eventuais correlações entre capacidade de infectar gerânio, classificação bioquímica e molecular, e origem dos isolados.

## 2. Revisão de Literatura

### 2.1 A doença

A murcha bacteriana é uma doença causada pela bactéria *Ralstonia solanacearum* (Smith, 1986) Yabuuchi *et al.*, 1995 (anteriormente chamada de *Pseudomonas solanacearum*). É uma doença considerada fator limitante para diversas culturas e é amplamente distribuída em regiões tropicais, subtropicais e temperadas do mundo (Hayward, 1991), ocorrendo em mais de 50 famílias botânicas (Hayward, 1994; Hayward, 2000; Lopes, 2005). Com a realidade atual do nosso planeta de perspectivas em relação ao aquecimento global, provavelmente este patógeno ganhará 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 para seu desenvolvimento (Lopes, 2005; Jeong *et al.*, 2007).

O primeiro relato da doença foi por volta de 1890 pelo bacteriologista T. Burril quando observou um apodrecimento em tubérculos de batata (Kelman, 1953; Lopes, 2005). No Brasil foi relatada pela primeira vez por Von Parseval (1922) em plantas de tabaco e batata, e hoje já se encontra distribuída por todo o país (Rodrigues, 2009). Entre as principais hospedeiras, se encontram as espécies da família Solanaceae (Hayward, 1994), embora várias outras famílias e espécies sejam afetadas, como as pertencentes às famílias Musaceae (Robbs, 1983), Heliconiaceae (Assis *et al.*, 2002) e as espécies: eucalipto (Dianese & Takatsu, 1985), maracujá (Lopes *et al.*, 1999), pimenta longa (Lopes *et al.*, 1997), gerânio (Almeida *et al.*, 1999), dentre outras (Malavolta *et al.*, 2008). Esta doença é de difícil controle e algumas vezes obriga a substituição da espécie cultivada, principalmente em regiões tropicais (Takatsu & Lopes, 1997)

## 2.2 Taxonomia

A mais recente classificação do patógeno de acordo com Kado (2010) é:

**Domínio:** Bacteria

**Filo:** Proteobacteria

**Classe:** Betaproteobacteria

**Ordem:** Burkholderiales

**Família:** Ralstoniaceae

**Gênero:** *Ralstonia*

**Espécie:** *Ralstonia solanacearum* (Smith, 1986) Yabuuchi *et al.*, 1995

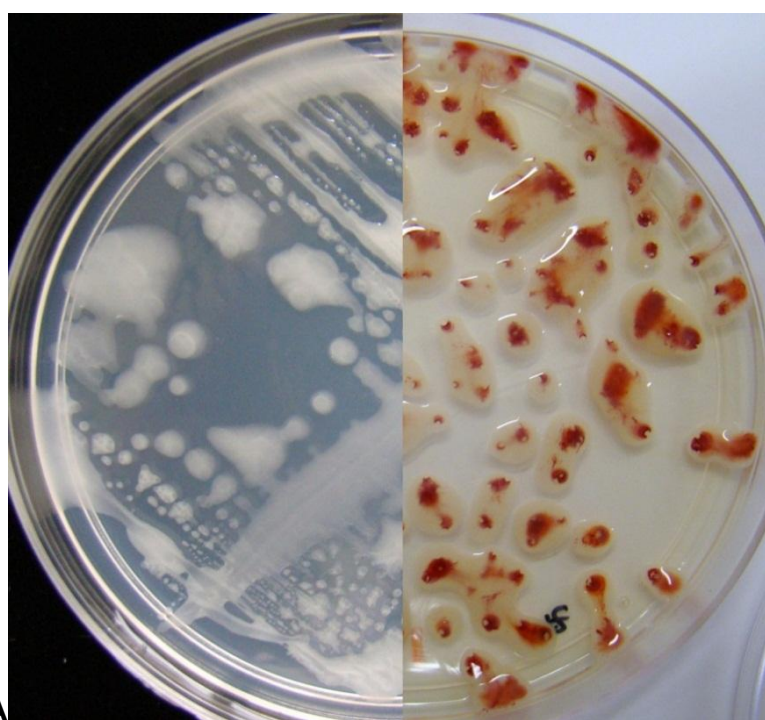
*Ralstonia solanacearum* é uma bactéria bastonetiforme aeróbica, habitante do solo, gram-negativa, pertencente à subdivisão  $\beta$  das proteobactérias. Seu genoma é composto de dois replicons circulares constituídos de um cromossomo de 3,7 megabases e um megaplasmídeo de 2,1 megabases, característica conservada em grande número de isolados analisados (Genin & Boucher, 2004).

As colônias de *R. solanacearum* em meios com ágar como CPG, Kelman, 523 (Denny & Hayward, 2001) se tornam visíveis com 36 horas a 28°C. A princípio as colônias são de coloração esbranquiçada, aspecto mucóide, circulares e levemente elevadas (Fig. 1) (Stanford & Wolf, 1917). Kelman (1964) idealizou um meio contendo tetrazólio que confere às colônias virulentas um centro de coloração rósea e de forma espiralada, enquanto saprófitas e mutantes avirulentos de *R. solanacearum* são vermelho escuras (Kelman, 1954).

## 2.3 Diversidade e Classificação

Isolados de *R. solanacearum* diferem em gama de hospedeiras, distribuição geográfica, patogenicidade e propriedades fisiológicas (Fegan & Prior, 2005). Buddenhagen *et al.* (1962) separaram isolados em três raças,

diferenciando principalmente na gama de hospedeiras: raça 1, patogênica a tabaco, tomate, outras solanáceas e algumas bananas diplóides (*Musa spp.*); raça 2, patogênica à bananas triplóides e heliconiáceas; raça 3, patogênica à batata, tomate, mas somente causando doença de baixa agressividade em outras solanáceas (Tabela 1). Porém, essa classificação apresenta algumas limitações como: alguns isolados de batata e amendoim são fracamente patogênicos ao tabaco, alguns isolados de banana e batata são fracamente patogênicos ao tabaco e outras raças podem ser excluídos quando utilizadas um menor número de hospedeiras diferenciais (Lozano & Sequeira, 1969).



**Figura 1.** Aparência de colônias virulentas de *Ralstonia solanacearum* nos meios de cultura.

A – Meio Kelman sem tetrazólio. B – Meio Kelman com tetrazólio. Foto: M. Rossato.

Seguido das raças, outra classificação infra-subespecífica para caracterizar este patógeno são as biovars, diferenciando de acordo com a habilidade de utilizar e/ou oxidar álcoois (dulcitol, manitol, sorbitol) e dissacarídeos (celobiose, lactose, maltose). As diferentes combinações designam uma determinada biovar para o isolado testado (Tabela 2) (Hayward, 1964). Dentro da biovar 2, que inicialmente correspondia à raça 3, específica

de batata, foi encontrada uma variação para isolados tropicais, os quais podem ser diferenciados pela temperatura em que podem manifestar sintomas, pelo consumo de trealose, inositol, D-ribose ou pela medida da atividade pectolítica (Tabela 3) (Hayward *et al.*, 1991). A biovar 2T é caracterizada pela capacidade de infectar uma gama de hospedeiras superior à da biovar 2A. A biovar 2A é mais adaptada à infectar um menor número de hospedeiras, em especial a batata, embora causando sintomas de murcha em temperaturas inferiores a 25°C e sendo responsável pelas infecções latentes em maior freqüências que outras biovars do patógeno (Hayward, 1991).

**Tabela 1.** Hospedeiras, biovars e local de ocorrência de *Ralstonia solanacearum* de acordo com as raças (Lopes, 2005; Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, 2011).

Raça	Hospedeira	Ocorrência	Biovar
1	Mais de 50 famílias botânicas	Ásia, Austrália, Américas	1, 3 e 4
2	Musaceae Heliconiaceae	e Brasil, Caribe, Filipinas	1
3	Batata e poucas outras espécies	Mundo, exceto EUA e Canadá	2
4	Gengibre	Ásia	3 e 4
5	Amora	China	5

Esta classificação, baseada em raças e biovars, leva em consideração a gama de hospedeiras e o consumo de carboidratos, demonstrando divergências quanto à classificação que usa o genoma. Após várias tentativas de agrupar os isolados de *R. solanacearum*, Fegan & Prior (2005) desenvolveram um método de classificação novo onde o principal fator de discriminação dos isolados é o genótipo. O sistema é composto por quatro filotipos e 51 sequevars até o momento (dados não publicados). O estudo dos filotipos começou com Cook *et al* (1989) que, utilizando técnicas de RFLP, separaram os isolados em grupos de acordo com sua origem, divisão 1 (asiaticus) e divisão 2 (americanus), classificação posteriormente ampliada com

a adição dos filotipos 3 e 4 filotipos; tais grupos apresentam certo grau de correlação com as biovars. A classificação atual em filotipos se baseia na variação de tamanho da sequência ITS (intergenic transcribed sequence), do cromossomo entre os genes de RNA ribossomal 16S e 23S (Garcia, 2009; Fegan & Prior, 2005) via PCR multiplex. As sequevars compõem um nível taxonômico inferior aos filotipos e estão relacionados ao sequenciamento do gene da endoglucanase (*egl*) (Wicker *et al.*, 2007), porém, podendo ser utilizado uma série de outros genes para realizar esta análise. Genes como o *mutS* e *hrpB* também podem ser utilizados para a identificação de sequevars; entretanto, a falta de uma base de dados suficientemente extensa, como a do gene *egl*, reduz o uso destes genes em análises filogenéticas. Outros genes estão sendo sugeridos, seguindo um dos princípios da filogenia molecular, onde se recomenda o uso de genes neutros ou “housekeeping”, como o do citocromo b561 (*cyt-b*) o qual apresentou uma boa correlação com o *egl* (Norman *et al.*, 2009)

**Tabela 2.** Determinação das biovars de acordo com as combinações de consumo de diversos álcoois e dissacarídeos (Hayward, 1964).

	1	2	3	4	5
<b>Utilização dos dissacarídeos</b>					
Celobiose	-	+	+	-	+
Lactose	-	+	+	-	+
Maltose	-	+	+	-	+
<b>Oxidação dos alcoóis</b>					
Dulcitol	-	-	+	+	+
Manitol	-	-	+	+	-
Sorbitol	-	-	+	+	-

Novas classificações estão sendo sugeridas para identificar padrões de virulência em grupos específicos de hospedeiras. Lebeau *et al.* (2011) propuseram os chamados perfis patogênicos (pathoprofile) e os patotipos (pathotypes); ambos agrupam os isolados segundo sua severidade e condições

para causar doenças em acessos de tomate, berinjela e pimenta. Os perfis patogênicos agrupam o comportamento dos isolados dentro de um grupo de hospedeiras de diversas espécies e os patotipos agrupam os isolados segundo sua virulência dentro de somente uma espécie de hospedeira.

**Tabela 3.** Subdivisões da biovar 2 de *Ralstonia solanacearum* de acordo com o consumo de açúcares e álcoois e atividade pectolítica. Reações podem variar de acordo com a origem geográfica dos isolados (Hayward *et al.*, 1991).

Teste	Biovar 2-	
	A	Biovar 2-T
Utilização de trealose	+	+
Utilização de Inositol	-	+
Utilização de D-ribose	-	+
Atividade pectolítica	Baixa	Alta

### 2.3 Sintomatologia

Os sintomas mais frequentes da murcha no gerânio são: murchamento das folhas (Fig. 2), podendo estes voltar a turgidez nas horas mais frias do dia, normalmente em seguida levando à morte da planta em um curto período de tempo. No caso de outra hospedeira importante, os tubérculos de batata também são afetados pela *Ralstonia* não somente com a infecção latente tornando-se fonte de inóculo como também provocando exsudação de pus bacteriano e reduzindo o tempo de armazenamento da batata até seu apodrecimento (Lopes, 2005).

Em gerânios os sintomas diferem das solanáceas, sendo muito similares aos da mancha bacteriana causada por *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii*; além da murcha verde similar ao estresse hídrico que ocorre nas horas mais quentes, pode haver amarelecimento das folhas mais velhas. Com o corte do caule, é possível verificar a presença de escurecimento do sistema vascular e exsudação de pus bacteriano (APHIS-USDA, 2008).



**Figura 2.** Muda de gerânio com sintomas iniciais de murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum*.

#### **2.4 O Gerânio**

Os gerânios (*Pelargonium* spp.) são importantes plantas ornamentais de casas de vegetação tanto para o comércio em vasos ou para o uso em solo. Há aproximadamente 280 espécies, todas nativas da África do Sul (Fonteno, 1992). Entre as principais espécies de gerânio cultivadas estão o *Pelargonium hortorum*, que é o mais comum, conhecido também como gerânio-de-chão ou gerânio-comum. *Pelargonium peltatum*, o gerânio-pendente, caracteriza-se pelo seu uso em floreiras e locais elevados, com diferenças significativas quanto à textura no caule e folhas, sendo estas não pilosas. Outras espécies de gerânio importantes são o gerânio de cheiro (*Pelargonium* spp.) e o conhecido como “regal” (*Pelargonium regal*), ambos de cultivo não muito disseminado pelo país. Esse gênero é caracterizado pela resistência à seca, produção de flores todo o ano e pela sua enorme variedade de cores.

O gerânio em vaso no Brasil em 2002 ficou entre as 12 espécies de plantas ornamentais mais cultivadas com 11 ha dedicados à cultura (IBRAFLO, 2002). Nos EUA, é a planta mais vendida para uso em

jardinagem, sendo responsável por um total de vendas de mais de 100 milhões de dólares no ano de 2009.

O gerânio apresenta uma série de doenças que podem ser fatores limitantes de sua produção. Na década de 1950, a mancha bacteriana, causada por *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* quase terminou com o cultivo até o estabelecimento de protocolos para controlar a doença. Quanto a murcha bacteriana, o aparecimento desta doença é mais recente. As perdas na cultura não são tão significativas quanto os riscos apresentados pelo transporte desse patógeno quarentenário e face ao risco de perdas que poderá causar no cultivo da batata em diversos países.

## **2.5 Métodos de detecção**

A bactéria *R. solanacearum*, além de apresentar infecção sistêmica com sintomas de murcha, pode também sobreviver no sistema vascular de hospedeiras de forma assintomática (infecção latente), dificultando a sua detecção. Por isso, existe a necessidade de aprimoramento das técnicas de detecção para evitar o transporte do patógeno para regiões onde é considerado praga quarentenária.

Uma técnica que pode ser usada antes dos métodos de detecção é o enriquecimento, que pode ser utilizado antes de praticamente todas as técnicas de detecção de diversas fitobactérias (Gorris *et al.*, 1994; Lopez *et al.*, 1997; Lopez *et al.*, 2000), aconselhada principalmente para screenings com hospedeiras assintomáticas. Tem por finalidade aumentar o número de células bacterianas para o intervalo ideal de sensibilidade dos testes, principalmente ELISA e PCR. Os meios utilizados são Wilbrink modificado (Caruso *et al.*, 2002) e SMSA (Elphinstone *et al.*, 1996). Seu uso é aconselhável também em casos que haja necessidade de detecção em água de irrigação e solo contaminado, onde a população bacteriana da espécie alvo é baixa e se encontra sob competição com muitas outras espécies.

### **2.5.1 Isolamento**

Com crescimento lento quando comparado a muitas outras bactérias, especialmente saprófitas, a *R. solanacearum* pode ser facilmente identificada por técnico treinado. O diagnóstico preciso, entretanto, deve estar associado a outras técnicas de diagnose assertiva, devido a alguns inconvenientes que a variabilidade fenotípica da bactéria apresenta *in vitro*, como colônias não típicas ou saprófitas com características de colônias similares às de *R. solanacearum*. O isolamento em meio semi-seletivo se apresenta ineficaz quando a bactéria está em baixas concentrações na hospedeira ou quando está em um estado viável, mas não cultivável (VMNC) (Alvarez *et al.*, 2008). O isolamento pode ser feito em meios semi-seletivos como o SMSA modificado, descrito por Englebrecht (1994), o que facilita a visualização. Este meio apresenta também outras modificações como, por exemplo, o SMSA com piruvato, que segundo testes realizados, pode recuperar as bactérias em estado VMNC (Imazaki & Nakaho, 2010).

### **2.5.2 Bioensaio**

O bioensaio é a inoculação de uma colônia pura, previamente isolada, em uma planta suscetível à raça e biovar em questão (McCarter *et al.*, 1969; Graham & Loyd, 1978). Esta prática pode exigir uma maior mão de obra e tempo a serem utilizados, o que poderia tornar inviável em lotes grandes ou uma grande quantidade de amostras. Geralmente só é funcional com colônias virulentas, porém o plantio de plantas teste suscetíveis em solos que apresentem células VMNC pode ajudar na detecção das mesmas.

### **2.5.3 Imunofluorescência (IF)**

Técnica amplamente utilizada pela União Europeia, depende do uso de anticorpos monoclonais associados aos extratos vegetais a serem analisados e com um microscópio com fluorescência, em que é possível a visualização das bactérias. O protocolo desenvolvido por Janse (1988) é eficaz para a identificação de *R. solanacearum*, porém apresenta limitações principalmente

no quesito população de bactérias no tecido (Clark, 1981). Esta técnica exige no mínimo  $10^4$  ufc/g de tecido vegetal analisado ou a chance de ocorrer falsos negativos aumentam significativamente tornando desaconselhável o uso desta prática (Elphinstone *et al.*, 1996). Outra limitação é a possível presença de contaminantes exigindo que o teste seja refeito (EU protocols, 2006)

#### **2.5.4 ELISA**

A DAS ELISA (double-antibody-sandwich indirect-enzyme-linked immunosorbent assay) é similar à técnica de IF e consiste em uma reação imunológica antígeno-anticorpo marcados com uma enzima para causar um efeito que possa ser medido em um espectrofotômetro. Podem ser usados anticorpos policlonais, que podem gerar muitas reações cruzadas com outras bactérias (Lopez *et al.*, 1997; Lopez *et al.*, 2000), por isso é recomendado o uso de anticorpos monoclonais, mais difíceis e caros de serem adquiridos, mas evitam transtornos com resultados errôneos. É um dos principais métodos para detecção de *R. solanacearum* em lotes de batata semente e outras hospedeiras em vários países.

#### **2.5.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)**

Os métodos moleculares são reconhecidos pela eficácia de detecção e por não requerer colônias puras, cultiváveis ou até mesmo virulentas. Apresenta grande sensibilidade, detectando até concentrações de  $10^1$  ufc/ml (Elphinstone *et al.*, 1996). Diversos protocolos de PCR e diferentes oligonucleotídeos específicos da região 16S e 23S rRNA foram descritos para detecção ou identificação de *R. solanacearum* (Seal *et al.*, 1993; Elphinstone *et al.*, 1996; Opina *et al.*, 1997; Fegan *et al.*, 1998; Boudazin *et al.*, 1999; Pastrok & Maiss, 2000; Poussier & Luisetti, 2000; Weller *et al.*, 2000). Diferentes variações aplicando a PCR podem ser feitos, alterando seus objetivos, sensibilidade ou até mesmo a dificuldade do teste. O Nested-PCR, desenvolvido por Elphinstone (1996), aumenta substancialmente a sensibilidade do teste, mas exige duas etapas que aumentam as chances de

contaminações (Elphinstone *et al.*, 1996; Llop *et al.*, 2000). O PCR em tempo real “Real time PCR” exige um equipamento apropriado, mas oferece uma série de vantagens. O tempo de todo o processo do PCR dura de 20 minutos a 2 horas, devido à velocidade superior de alterações térmicas durante o processo, e a utilização de capilares e aquecimento por luz reduz o tempo de aquecimento para 1 a 2 segundos (Gachon *et al.*, 2004). Algumas máquinas permitem o uso de 384 amostras ao mesmo tempo trabalhando ininterruptamente (Wurmbach *et al.*, 2003), o que pode ser uma vantagem determinante para alguns estudos que exijam um processamento rápido de amostras (Schnerr *et al.*, 2001). O Co-PCR, ou PCR co-operacional (Caruso *et al.*, 2003), é um tipo de PCR onde são utilizados três ou mais primers simultaneamente na mesma amostra, evitando a necessidade de divisão do processo em dois passos e, conseqüentemente, reduzindo a chance de contaminações. Permite uma detecção com a mesma sensibilidade do Nested-PCR ( $10^1$  ufc/ml) e não exige duas temperaturas distintas de anelamento (Olmos *et al.*, 2002).

### **3. Material e Métodos**

#### **3.1 A escolha dos isolados**

Os isolados utilizados neste trabalho fazem parte da coleção da Embrapa Hortaliças e foram coletados de diferentes estados do país, de diversas hospedeiras e em diferentes épocas ao longo de 20 anos.

A principal característica para a escolha dos isolados foi que pertencessem à biovar 2, porque é a que tem restrição para exportação. Foram incluídos também isolados de outras hospedeiras e biovares para comparar os resultados das diferentes raças e biovares existentes no Brasil, já que não existem informações sobre eventual especificidade de isolados em relação à hospedeira, como acontece com a bananeira em relação à raça 2. Como testemunhas, foram utilizados dois isolados, obtidos originalmente de

*Pelargonium* sp., adquiridos do Instituto Biológico de São Paulo (IB). O número de isolados de *R. solanacearum* totalizou 36, considerado um número representativo da população de *R. solanacearum* de todo país (Quadro. 1).

Os isolados foram multiplicados em meio Kelman sem tetrazólio (CPG), incubados por 48 h a 28°C e preservados em tubos de armazenamento criogênico de 5 ml da Sarstedt® contendo água de poço autoclavada. Os isolados foram preservados também em congelador a -80°C, utilizando meio CPG + Glicerol 20% (Denny & Hayward, 2011).

**Quadro 1.** Isolados de *Ralstonia solanacearum* usados para testes de patogenicidade em gerânio.

Referência CNPH (RS#)	Hospedeira	Cidade/Estado	Ano	Biovar
12	Batata	Itapetininga – SP	1987	2
23	Batata	Mucugê – BA	1988	2
28	Batata	Castro – PR	1988	2
30	Batata	Umuarama – PR	1988	2
44	Batata	PAD-DF	1988	2
61	Batata	Castro – PR	1988	2
66	Batata	Ibicoara – BA	1990	2
92	Batata	PAD-DF	1990	2
93	Batata	Pirai do Sul – PR	1992	2
95	Batata	Pirai do Sul – PR	1992	2
119	Batata	Ibiá – MG	1992	1
134	Batata	Contenda – PR	1992	2
177	Pimenta Longa	Belém – PA	1995	1
205	Batata	Cristalina-GO	1998	2
210	Banana	IMPA-AM	2002	1
213	Batata	Ibicoara – BA	2001	2
219	Chicória	Sta. Izabel – PA	2002	1
224	Maracujá	Belém – PA	2002	1
232	Batata	Buritis – MG	2005	2
238	Batata	Guarapuava – PR	2003	2
240	Batata	Cristalina – GO	2003	2
243	Batata	Saturno – SP	2004	2
244	Batata	Saturno – SP	2004	2
245	Batata	Cid. Ocidental – GO	2004	2
250	Batata	Araucária – PR	2004	1

251	Batata	Araucária – PR	2005	2
252	Batata	Contenda – PR	2005	2
253	Batata	Contenda – PR	2005	2
255	Batata	Contenda – PR	2005	1
257	Tomate	Santo Amaro – SC	2005	1
260	Batata	Mucugê – BA	2005	2
AC -1	Pimenta L.	Rio Branco – AC	2005	1
263	Batata	Santo André – SP	2010	2
284	Tomate	Eirunepé – AM	2005	1
292	Jiló	Gurupi – TO	2007	3
298	Eucalipto	Carbonita – MG	2007	1
310	Tomate	Fort do Tabocão - TO	2005	3
248	Tomate	São José dos Pinhais - PR	2008	2
258	Tomate	Santo Amaro – SC	2005	1
380	Pimentão	Camocin de S. Felix - CE	2005	3
381	Tomate	Nova Friburgo - RJ	2008	1
387	Batata	Pouso Alegre - MG	2008	2
423	Tomate	AM	2009	1
RS 221R	Tomate	Ponte Alta - DF	2006	1
UFV1	Batata	Guarapuava - PR	2003	2
IB -1	Gerânio	-	-	1
IB - 2	Gerânio	-	-	1

## 3.2 Identificação dos isolados

### 3.2.1 Confirmação de espécie de *Ralstonia solanacearum*

Para garantir a identidade dos isolados, como sendo da espécie *R. solanacearum*, uma série de procedimentos de PCR foi realizada. Os iniciadores (*primers*) selecionados para esta etapa foram os primers universais 759/760, que identificam ampla gama de isolados e geram um produto de 282 pb (Opina *et al.*, 1997). A reação foi composta por: 1X Tampão da Taq DNA polimerase, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,25 mM de dNTPs, 0,4 µM de cada um dos primers, 1U de Taq DNA polimerase, adicionando água MilliQ para completar o volume para 25µL.

Alguns produtos da reação foram analisados em gel de agarose 1% e corados com 1 µL de GelRed (Biotium) ou brometo de etídio. Os géis foram analisados em um transiluminador com luz ultravioleta. O programa do

termociclador utilizado foi desnaturação inicial a 96°C/3 min, 35 x(94°C/ 30 s, 60°C/ 30 s, 72°C /45 s) e extensão final de 72°C/5 min. Todos os isolados não identificados nesta etapa como *R. solanacearum* foram eliminados do experimento.

### **3.2.2 Determinação da biovar**

As biovars foram determinadas segundo a metodologia proposta por Hayward (1994). Um meio básico contendo 1% de diferentes fontes de carbono foi preparado usando maltose, lactose, celobiose e os dissacarídeos manitol, sorbitol e dulcitol. Os meios foram depositados na quantidade de 2 ml em cada poço de uma placa do tipo *DeepWell* da Sarstedt®. Seis poços contendo 10 µL de suspensão bacteriana de cada isolado foram usados, cada poço contendo um carboidrato. As placas foram mantidas a 28°C e as leituras ocorreram aos 3, 5, 7 e 14 dias após a deposição da suspensão no meio. A mudança da cor do meio de cultura de verde para amarelo indicou o uso do meio pela bactéria, o que foi considerado positivo. Os isolados da R3B2 não foram identificados quanto aos seus subfenótipos de biovar 2, já que geralmente são tratados sem diferença pelos laboratórios de detecção e diagnose de fitopatógenos.

### **3.2.3 Extração de DNA genômico**

A extração de DNA foi feita de acordo com o protocolo de Mahuku (1991), com modificações. As bactérias foram riscadas em meio Kelman sólido e incubadas a 28°C por 48 h. Colônias características de *R. solanacearum* foram repicadas para outra placa e incubadas sob as mesmas condições da mesma forma. As colônias foram raspadas, armazenadas em microtubos de 1,5 ml com água Milli-Q e congeladas até o processo de extração.

As colônias descongeladas foram centrifugadas por 15 min a 10000 rpm para o descarte da água e, em seguida foram adicionados 200 µL de TE, 30 µL

de SDS (20%) e 10  $\mu$ L de Proteinase K, com homogeneização por meio de um vortex e 40 min em banho maria (60°C). Foram adicionados 250  $\mu$ L 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  $\mu$ L) transferido para um novo tubo. O mesmo volume foi adicionado de isopropanol e incubado à -20°C por 1 a 2 horas. Centrifugou-se por 20 minutos a 13000 rpm e o sobrenadante, descartado, seguido de uma lavagem com 800  $\mu$ L de etanol 70%. Após descarte do etanol, o pellet foi seco e hidratado com água MilliQ para ser armazenado à -20°C.

### **3.2.4 Identificação dos filotipos**

Os filotipos foram identificados pelo uso da técnica de PCR Multiplex, que utiliza diversos primers em conjunto, Nmult: 21: 1F, Nmult: 21: 2 F, Nmult: 22: inf, Nmult: 23: AF, e somente um primer no sentido reverso, o Nmult: 22: RR. A identificação dos filotipos se baseia na amplificação da região do 16S e os diferentes fragmentos gerados, indicam os diferentes filotipos (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 de 91 pb e para o filotipo IV 213 pb (Tabela 6). A reação conteve: 1X tampão da Taq DNA polimerase, 0,2 mM de dNTPs, 1,5 mM de  $MgCl_2$ , 2U de taq polimerase, 0,24  $\mu$ L dos primers Nmult:21: 1F, Nmult:21: 2F, Nmult:22: InF, 0,4  $\mu$ L do primer Nmult22: RR, 0,72  $\mu$ L do primer Nmult: 23: AF e água MilliQ até completar 25  $\mu$ L de volume total. A PCR seguiu o 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. Os tamanhos dos fragmentos amplificados foram estimados por comparação com o marcador molecular de 1kb em um transiluminador de luz ultravioleta.

### 3.3 Patogenicidade de isolados de *Ralstonia solanacearum* a *Pelargonium peltatum* e *Pelargonium hortorum*.

A capacidade de isolados de *R. solanacearum* infectarem plantas de gerânio foi avaliada em etapas. Na primeira, foi utilizada somente a variedade 309 de gerânio pendente (*P. peltatum*) (Fig. 3) fornecida pela empresa Lazzeri, de Vacaria-RS, produzidas a partir de sementes verdadeiras e mantidas em casa de vegetação até o momento da inoculação. Para se certificar que os isolados mantinham a virulência, os 36 isolados foram também inoculados em plantas de tomateiro 'San Vito' e de batata 'Monalisa', reconhecidamente altamente suscetíveis à murcha bacteriana. O tomateiro foi inoculado com aproximadamente 25 dias após a semeadura, com quatro folhas verdadeiras, e a batata por meio de mudas com 15 dias de idade obtidas pelo plantio de brotos de tubérculos. Plantas de banana foram utilizadas para avaliar a virulência do isolado da raça 2.

**Quadro 2.** Primers utilizados na identificação da espécie e dos filotipos de *Ralstonia solanacearum*.

Primer	Sequência	Referência
<b>Universal</b>		
759	5'-GTC GCC GTC AAC TCA CTT TCC-3'	Opina <i>et al</i> , 1997
760	5'-GTC GCC GTC AGC AAT GCG GAA TCG-3'	Opina <i>et al</i> , 1997
<b>Filotipos</b>		
Nmult: 21:1F	5' -CGT TGA TGA GGC GCG CAA TTT-3'	Fegan e Prior, 2005
Nmult: 21:2F	5' -AAG TTA TGG ACG GTG GAA GTC-3'	Fegan e Prior, 2005
Nmult: 23:AF	5' -ATT ACS* AGA GCA ATC GAA AGA TT- 3'	Fegan e Prior, 2005
Nmult: 22: inf	5' -ATT GCC AAG ACG AGA GAA GTA-3'	Fegan e Prior, 2005
Nmult: 22:RR	5' -TCG CTT GAC CCT ATA ACG AGT A- 3'	Fegan e Prior, 2005

Os isolados de *R. solanacearum* foram cultivados em meio Kelman sem tetrazólio e incubados em uma câmara de crescimento por dois dias a 28°C. A

partir daí, colônias típicas foram repicadas para novas placas sob as mesmas condições. Todas as plantas, três dias antes da inoculação, foram transplantadas para vasos de 1 L e posicionadas em casa de vegetação de vidro (20°C – 40°C) da Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, equipada com aquecedor automático para manter a temperatura noturna nunca abaixo de 20°C.

O método de inoculação utilizado foi de penetração da região da coroa, cerca de 3 cm acima no nível do solo, com um alfinete de costura N°7 invertido e com a extremidade oposta lixada para formar uma pequena lâmina. A ponta da agulha foi cravada em uma rolha, para facilitar a inoculação. Foram usadas 10 plantas de gerânio, quatro de tomate e quatro de batata para cada isolado, sendo dois isolados considerados testemunhas e que tinham como hospedeira de origem o gerânio (Quadro. 1).

As avaliações foram feitas diariamente avaliando-se a incidência da doença, a partir do dia seguinte à inoculação. Um gráfico foi confeccionado utilizando a área abaixo da curva de progresso da doença (aacpd)(Fig. 7), a aacpd foi calculada com a ajuda do programa Microsoft Excel®.



**Figura 3.** Mudanças de *Pelargonium peltatum* cedidas pela Empresa Lazzeri, utilizadas nos testes de patogenicidade de isolados de *Ralstonia solanacearum*.



**Figura 4.** Vista geral do experimento de patogenicidade de isolados de *Ralstonia solanacearum* em mudas de gerânio da variedade 309. Embrapa Hortaliças – 2011.

### **3.3.1. Reavaliação da capacidade de infecção de isolados selecionados de *R. solanacearum*.**

Para selecionar os isolados para o próximo experimento, levando em consideração os resultados descritos acima, foram escolhidos 10 isolados (Tabela 4) que tiveram características interessantes, como virulência diferenciada e que deveriam ser analisadas usando maior número de plantas para uma melhor comparação dos resultados entre eles.

**Tabela 4.** Isolados de *Ralstonia solanacearum* selecionados para repetição do teste de incidência da murcha bacteriana em plantas de batata, *Pelargonium hortorum* e *Pelargonium peltatum*.

Isolado	Hospedeira	Local	Data	Biovar
RS 23	Batata	Mucugê – BA	1988	II
RS 93	Batata	Pirai do Sul - PR	1992	II
RS 95	Batata	Pirai do Sul - PR	1992	II
RS 134	Batata	Contenda – PR	1995	II
RS 213	Batata	Ibicoara – BA	2002	II
RS 250	Batata	Araucária	2005	I
RS 252	Batata	Contenda – PR	2005	II
RS 263	Batata	Santo André - SP	2005	II
RS 292	Jiló	Gurupi – TO	2009	III
IB 1	Gerânio			I

Neste segundo experimento, foram usadas 10 plantas adultas de gerânio comum (*P. hortorum*) produzidas por produtores locais, 10 de gerânio pendente (*P. peltatum*) fornecidas pela Lazzeri® e 10 de batata 'Monalisa'. A batata foi multiplicada a partir de tubérculos brotados plantados em vasos de 3 L; após seu crescimento, ramos uniformes de 5 a 8 cm foram seccionadas com um bisturi e postas em bandejas de isopor de 72 células com substrato PlantMax® para enraizamento, para então serem transplantadas antes da inoculação para vasos de 1 L. Todas as condições do experimento anterior foram repetidas. As avaliações de incidência da murcha bacteriana se iniciaram cinco dias após a inoculação e continuaram por 30 dias.

### 3.3.2. Avaliação da variação da capacidade infectiva em quatro variedades de *P. peltatum*.

A resistência de diferentes variedades de gerânio pendente foi avaliada para verificar se existem variações de suscetibilidade diante da infecção por *R. solanacearum*. Quatro variedades de gerânio pendente, 322, 305, 316 e 337, produzidas pela Lazzeri® foram avaliadas com seis isolados diferentes e com 20 plantas por isolado por variedade (Tabela 5). Todas as plantas foram submetidas aos mesmos procedimentos usados anteriormente. Os isolados foram selecionados baseado nas características de cada um, como por

exemplo, hospedeiro de origem, biovar e local de origem, e nos resultados do primeiro experimento, foram escolhidos segundo a virulência. O isolado RS 244 foi escolhido por ser patogênico à batata, e não ter causado doença na variedade 309.

**Tabela 5.** Isolados de *Ralstonia solanacearum* selecionados para o teste de resistências das variedades de *Pelargonium. peltatum*.

Isolado	Hospedeira	Local	Data	Biovar
RS 30	Batata	Umuarama - PR	1988	II
RS 134	Batata	Contenda - PR	1995	II
RS 244	Batata	Saturno - SP	2004	II
RS 263	Batata	Santo André - SP	2005	II
RS 381	Tomate	Nova Friburgo - RJ	2008	I
IB 1	Gerânio	-	-	I

‘-‘ Informação não disponível

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1 Capacidade de infectar *Pelargonium* sp., batateira e tomateiro

No primeiro experimento, foram testados 36 isolados aqueles que não demonstraram patogenicidade em nenhuma das hospedeiras foram removidos do trabalho, já que neste está sendo avaliado somente isolados virulentos, independente da confirmação da etiologia por técnicas de PCR. Uma das consequências dos cultivos sucessivos *in vitro* é a perda de virulência do isolado, característica notada em 10 isolados.

No quarto dia após a inoculação nas plantas de batata, diversos isolados já provocaram a murcha de todas as plantas e no oitavo dia todos os isolados virulentos já tinham causado doença (Tabela 6). Poucos casos de escape foram observados. Quando tomateiros e gerânios foram inoculados, ao terceiro

dia após a inoculação, alguns isolados já apresentavam plantas de tomate murchas, evoluindo rapidamente ao longo das avaliações. No décimo primeiro dia, os isolados virulentos já haviam provocado murcha em todos os tomateiros e o isolado RS 210, originalmente de banana, foi capaz de murchar todas as plantas de banana inoculadas. Durante as avaliações, foi notado que as plantas de *P. peltatum* iniciaram os sintomas cinco dias após a inoculação, porém ainda em fase inicial; então, mais tempo foi dado para que a planta apresentasse o sintoma característico de murcha irreversível. Os isolados só foram considerados virulentos quando mais de 20% das plantas apresentavam os sintomas característicos da doença como resultado da inoculação.

Nos gerânios, os sintomas encontrados foram os esperados, murcha verde, necrose nas extremidades de folhas mais velhas, necrose ou murcha das ponteiros e inflorescência (figura 5). Durante a condução do experimento, foi também observado uma clorose das folhas jovens que foi atribuída à elevada temperatura mantida na casa de vegetação para garantir a manifestação da murcha bacteriana.

A análise dos dados foi realizada com 36 isolados, comparando, a princípio, somente a capacidade de infectar a hospedeira e não a virulência ou agressividade desses. Para cada isolado, 10 plantas de gerânio, quatro de tomate e quatro de batata foram inoculadas, dezenove dos 36 isolados foram capazes de infectar uma ou duas das espécies testadas e 17 infectaram ao menos uma planta nas três espécies hospedeiras avaliadas (Tabela 6).

Nenhuma das testemunhas não inoculadas apresentou sintomas de qualquer tipo, comprovando que não havia outros patógenos no sistema ou que as condições climáticas eram desfavoráveis para a sobrevivência e desenvolvimento das plantas estudadas (figura 6.).



**Figura 5.** Sintomas ocorridos nos gerânios pela inoculação de *Ralstonia solanacearum*. **A** – Vista geral da planta com murcha verde; **B** -Necrose nas bordas de uma folha; **C** - Necrose das ponteiros; **D** – Necrose da inflorescência; **E, F** – Murcha em folha adulta.

**Tabela 6.** Incidência (%) de murcha bacteriana em plantas de gerânio, batata e tomate com mais de 50% de folhas murchas. Gerânios com 10 plantas, tomate e batata com 4 plantas cada. Resultado das avaliações nas três hospedeiras avaliadas com os isolados de *Ralstonia solanacearum* que apresentaram capacidade de infectar ao menos uma das espécies avaliadas

Isolado	Gerânio (10)	Tomate (4)	Batata (4)	Hospedeira	Data	Bior	Filotipo
RS 23	80	100	100	Batata	1988	2	II
RS 28	0	50	0	Batata	1988	2	II
RS 30	100	100	100	Batata	1988	2	II
RS 44	10	100	100	Batata	1988	2	II
RS 61	80	100	100	Batata	1990	2	II
RS 66	20	0	100	Batata	1990	2	II

RS 92	50	100	100	Batata	1992	2	II
RS 93	50	100	100	Batata	1992	2	II
RS 95	0	100	100	Batata	1992	2	II
RS 134	0	100	100	Batata	1995	2	II
RS 177	50	100	100	Pimenta Longa	1998	1	I
RS 210	0	75	75	Banana	2002	1	II
RS 213	50	75	0	Batata	2002	2	I
RS 219	0	25	0	Chicória	2002	1	II
RS 238	0	0	75	Batata	2003	2	II
RS 240	0	0	100	Batata	2004	2	II
RS 243	0	0	25	Batata	2004	2	II
RS 244	0	0	75	Batata	2004	2	II
RS 245	0	0	25	Batata	2004	2	II
RS 248	0	0	100	Tomate	2005	2	II
RS 250	0	100	100	Batata	2005	1	II
RS 251	0	0	100	Batata	2005	2	II
RS 252	0	100	100	Batata	2005	2	II
RS 253	0	75	75	Batata	2005	2	II
RS 255	90	100	100	Batata	2005	1	II
RS 260	0	25	50	Batata	2005	2	II
RS 263	70	50	50	Batata	2005	2	II
RS 284	60	100	100	Tomate	2007	1	II
RS 292	60	100	100	Jiló	2008	3	II
RS 298	0	100	100	Eucalipto	2005	1	II
RS 310	70	100	100	Tomate	2008	3	II
RS 381	80	100	100	Tomate	2008	1	II
RS 461	10	100	100	Tomate	2011	1	II
AC 1	90	100	100	Pimenta Longa	2010	1	II
IB							
1708	100	100	100	Gerânio	-	-	II
IB							
1711	100	100	100	Gerânio	-	-	II

‘-’ Informação não disponível

Os resultados da tabela 6 permitiram identificar que várias das características do isolado, como local, hospedeira e idade do isolado não foram relevantes para serem considerados como fatores associados à capacidade de infectar uma determinada hospedeira. Tanto os isolados mais novos, como os de 1988, provocaram doença com mesma intensidade. Em geral, culturas de isolamento mais recente são mais virulentos (ou agressivos) que isolados submetidos a diversas transferências para meios de cultura para fins de armazenamento e renovação da coleção. No entanto, alguns isolados parecem manter melhor essa virulência após sucessivas repicagens.



**Figura 6.** Vista geral do experimento de patogenicidade em gerânios da variedade 309, 35 dias após a inoculação com *Ralstonia solanacearum*.

Quanto à hospedeira de origem, não foi possível verificar índices superiores de infecção nos isolados que tinham a hospedeira de origem igual a inoculada, a não ser o isolado da raça 2, específica da banana, que não apresentou capacidade de infectar as espécies avaliadas. A classificação em biovars também não foi útil para agrupar os isolados de acordo com capacidade de infecção.

Com os dados de incidência avaliada por meio de avaliações periódicas, foi observado que isolados mais agressivos apresentaram a mesma proporção de velocidade de infecção para o gerânio, sendo esta hospedeira, entretanto, mais resistente à murcha bacteriana quando comparado com a batata e tomate, assim considerado por apresentar maior período latente em relação às demais hospedeiras. Este fato explica, pelo menos em parte, a maior capacidade de o gerânio servir como fonte de inóculo em infecções latentes.

Foi verificado que poucos isolados afetaram o gerânio e que este demorou a murchar. A maior parte dos isolados foi capaz de infectar a batata que começou a murchar até com três dias após a inoculação (Tabela 6). Com as solanáceas, os sintomas se manifestaram rapidamente e evoluíram, afetando até 100% das plantas em pouco tempo, fato confirmado pelos valores da área abaixo da curva de progresso da doença, o índice de doença bem mais altos que nos gerânios (Figura 7). A aacpd calculada com a ajuda o Excel®.

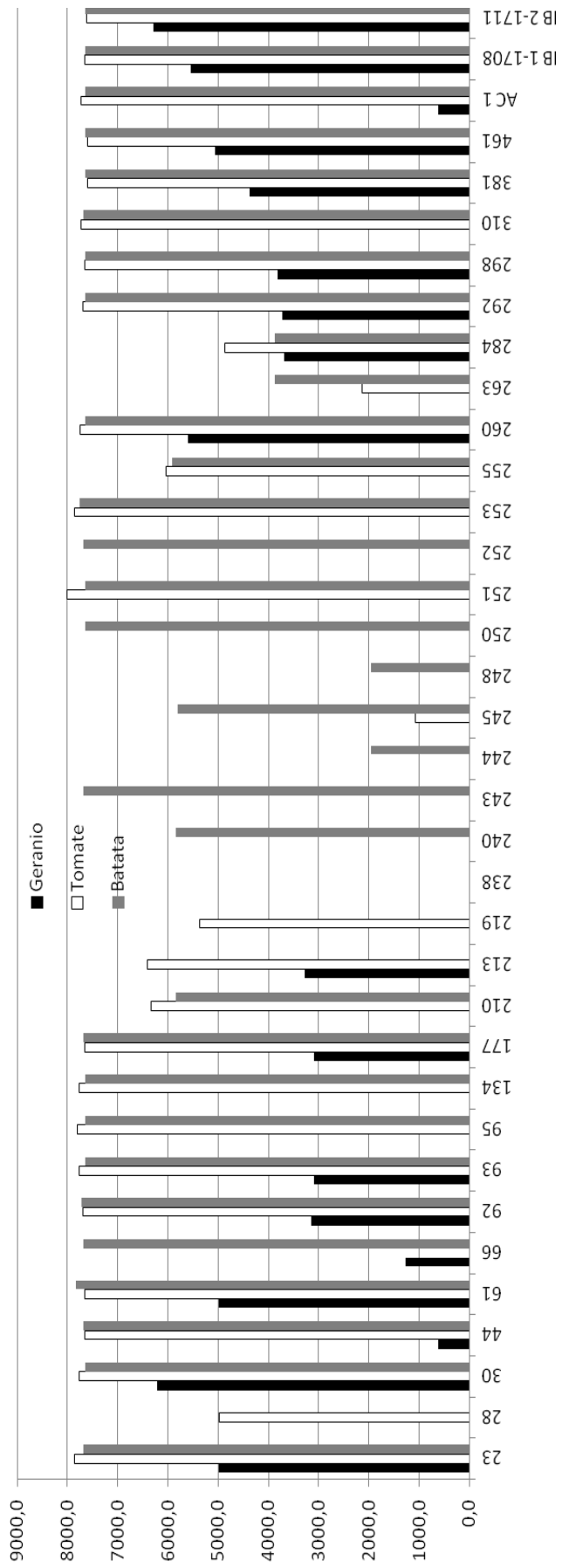
Os isolados brasileiros, exceto o da raça 2, foram capazes de infectar o gerânio, o fato da maioria do gerânio ser produzido por sementes reduz as chances de infecções latentes, já que esta é associada geralmente à propagação vegetativa; entretanto, deve ser lembrado que esse tipo de infecção ainda pode ocorrer de outras formas, como substrato e água contaminados. Não foram feitas análises de infecção latente; mesmo esta não sendo esperada devido às condições favoráveis à doença, as quais estimulam o aparecimento de sintomas. Não se pode eliminar a possibilidade de que houve infecções latentes em algumas plantas com alguns isolados. Todas as variantes (exceto a raça 2), biovars e filotipos testados foram capazes de afetar o gerânio, podendo ser afirmado que em qualquer parte do país onde existe a bactéria, há a possibilidade de infecções ocorrerem.

Depois do primeiro relato da R3B2 na Suécia em 1976 (Olson, 1976), as barreiras quarentenárias foram aprimoradas para contenção do patógeno entre os países; entretanto, desde então, o número de surtos de murcha bacteriana tem aumentado significativamente (Marco-Noales *et al.*, 2008). Ainda depois de todos os relatos do patógeno na UE, a fiscalização não ocorre efetivamente sobre o gerânio e, além disso, seus protocolos exigem o cultivo do patógeno para confirmação e rejeição do material importado. Frequentemente o gerânio está associado à infecções latentes, o que pode gerar falsos negativos nos testes moleculares e convencionais de detecção da *R. solanacearum*. Portanto, este tipo de infecção facilmente atravessa as barreiras quarentenárias de forma silenciosa, permitindo a entrada do patógeno por essa hospedeira alternativa que é considerado o gerânio.

No Brasil, as principais áreas produtoras de plantas ornamentais, especificamente de gerânios, são as Regiões Sul e Sudoeste, ambas com relatos frequentes da R3B2 especialmente em batata. No entanto, há poucos relatos de murcha bacteriana em gerânios no Brasil, embora isso não exclua a possibilidade da ocorrência do problema para produtores exportadores de gerânio.

#### **4.1.2 Experimento com isolados selecionados.**

Houve uma pequena diferença na resposta das hospedeiras quando inoculadas novamente nas plantas, desta vez com mais repetições (Tabela 7). A batata, que anteriormente apresentou 100% de plantas murchas na maior parte dos isolados, oscilou entre 70 e 100%. Nos gerânios, houve diferença entre eles, sendo o *P. hortorum* mais suscetível à murcha bacteriana que o *P. peltatum*. Não pode ser afirmado que uma determinada variedade de *P. hortorum* é mais suscetível, pois, para o experimento, foi utilizado uma mistura de diversas variedades de forma aleatória. Todos os isolados confirmam o fato de os gerânios não serem tão suscetíveis quanto a batata e que existem diferenças de virulência/agressividade entre isolados. A mesma resposta aos isolados foi observada em relação ao experimento anterior. Recomendação de qual espécie seria mais segura para o cultivo para evitar a disseminação do patógeno ou perdas não pode ser feita já que ambas as espécies avaliadas demonstraram repostas similares, igualmente suscetíveis. Para verificar a resistência dentro das espécies, seria necessário um maior número de variedades para representar a espécie em si já que a resposta pode variar segundo a variedade testada.



**Figura 7.** Área abaixo da curva de progresso da doença dos isolados de *Ralstonia solanacearum* inoculados em gerânio, tomate e batata.

**Tabela 7.** Incidência (%) de murcha bacteriana em batata (10 plantas), *Pelargonium hortorum* (8 plantas) e *Pelargonium peltatum* (10 plantas) aos 30 dias após a inoculação.

<b>Isolados</b>	<b>Batata</b>	<b><i>P.</i> <i>hortorum</i></b>	<b><i>P.</i> <i>peltatum</i></b>
<b>RS 23</b>	90,0	12,5	0
<b>RS 93</b>	100,0	62,5	20,0
<b>RS 95</b>	70,0	25,0	0
<b>RS 134</b>	100,0	62,5	10,0
<b>RS 250</b>	80,0	25,0	0
<b>RS 252</b>	90,0	12,5	30,0
<b>RS 263</b>	70,0	75,0	30,0
<b>RS 292</b>	100,0	75,0	80,0
<b>RS 381</b>	100,0	87,5	30,0
<b>IB 1708</b>	80,0	75,0	80,0

A diferença entre os isolados RS 93 e RS 95, ao contrário do experimento anterior, foi notada devido à presença do *P. hortorum* sendo avaliado. O RS 93 foi novamente capaz de causar doença em um índice superior ao RS 95, causando sintomas de murcha em *P. hortorum*. Seria necessário estudar o isolado em busca dos fatores associados à patogênese, conhecido por ser responsável pela diferença na virulência.

#### **4.1.3 Resistência de quatro variedades de *P. peltatum* a *R. solanacearum*.**

No experimento de avaliação de resistência das quatro variedades de gerânio, as avaliações foram iniciadas cinco dias após a inoculação. Os sintomas evoluíram rapidamente e os resultados foram similares aos do experimento principal. Nenhuma das variedades foi considerada resistente, com a resistência do tipo imunidade. Houve variações de até 40% na incidência entre as variedades com o isolado IB 1708. A variedade 337 foi considerada a mais suscetível devido à maior incidência da doença com todos os isolados. A variedade 322 mostrou resultados similares à '305' com uma suscetibilidade inferior as demais (Tabela 8). Esses resultados confirmam o relato de Norman *et al.* (2009), que a maior parte das variedades de *P. peltatum* são suscetíveis

à murcha bacteriana (Tabela 8). Essas variações na incidência não descarta a possibilidade de que as plantas estivessem com infecções latentes, mas essa resposta à inoculação não é esperada devido a estratégia usada que ameniza as chances de esse tipo de infecção ocorrer. Como no primeiro experimento, o isolado RS 244 não causou murcha nas variedades de *P. peltatum* avaliadas, mostrando que a '309' não tinha resistência ao isolado e sim que o isolado não foi capaz de causar murcha ao gerânio (Tabela 8), embora tenha sido virulento à batata.

**Tabela 8.** Incidência (%) de murcha bacteriana em quatro variedades de *Pelargonium peltatum* 30 dias após a inoculação com *Ralstonia solanacearum*.

Variedades	Isolados					
	RS 30	RS 134	RS 244	RS 263	RS 381	IB 1708
<b>322</b>	83,3	94,4	0,0	61,1	88,9	66,7
<b>305</b>	77,8	88,9	0,0	61,1	94,4	72,2
<b>316</b>	100,0	100,0	0,0	72,2	94,4	83,3
<b>337</b>	100,0	100,0	0,0	88,9	100,0	100,0

#### 4.2 Identificação de filotipos

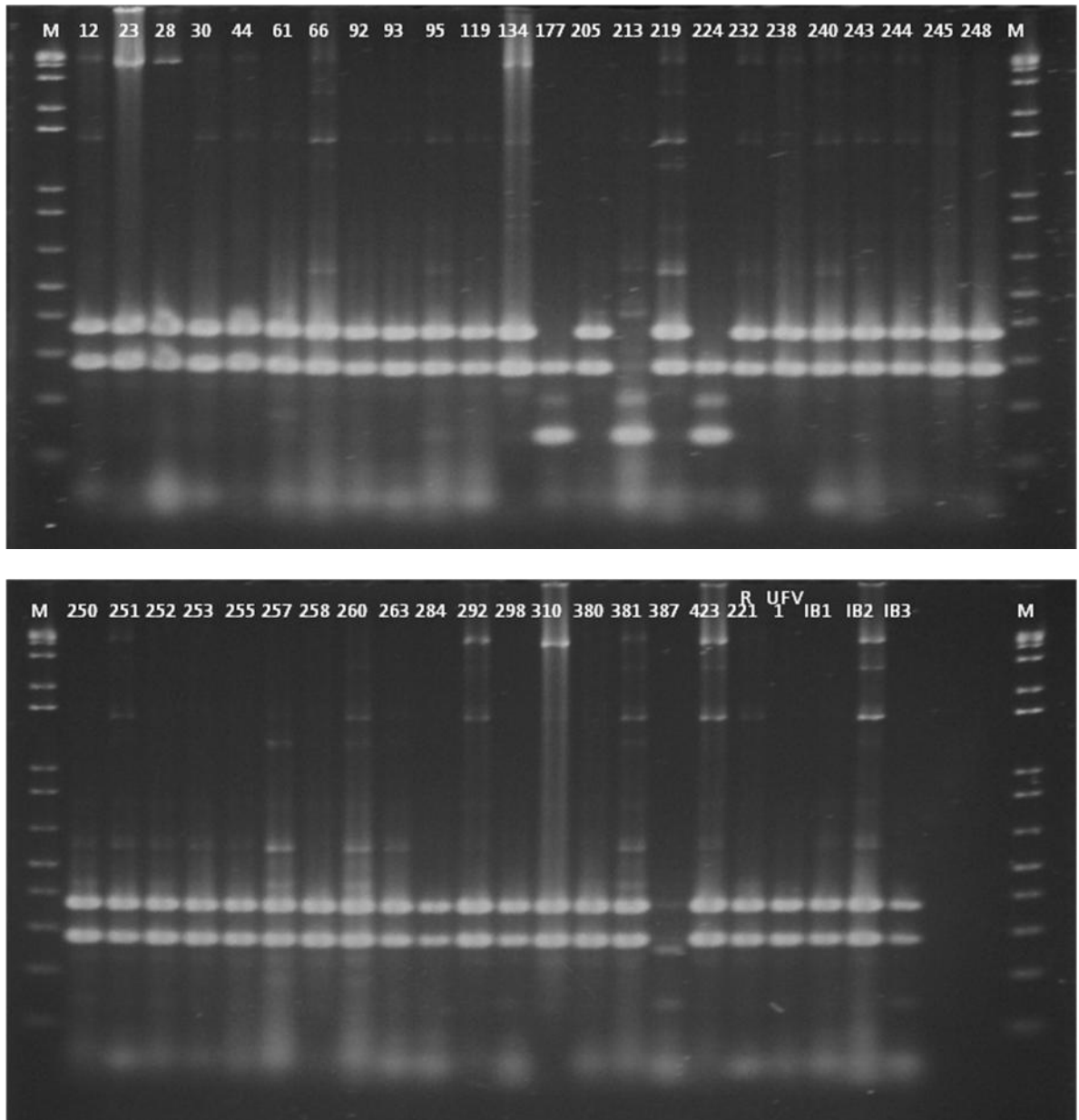
O filotipo que predominou na análise dos isolados foi o filotipo II, resultado já esperado devido ao fato de este ser originário das Américas (Fegan & Prior, 2005), porém consolidando esta classificação com isolados brasileiros de *R. solanacearum*. Dos isolados selecionados, somente dois isolados, ambos da biovar I (RS 177, RS 213) apresentaram o fragmento de 114 pbs (Figura 8), o qual agrupa esses no filotipo I de suposta origem no continente asiático, segundo a proposta dos filotipos. Os outros 34 isolados foram identificados como sendo filotipo II através do PCR Multiplex (Figura 8). As ampliações inespecíficas presentes não alteram ou dificultam a análise dos resultados, devido à intensidade dos fragmentos gerados nos locais esperados (114 pbs, 372 pbs e 280 pbs).

Ao contrário dos resultados de Pinheiro *et al.* (2011), nenhum isolado do filotipo III foi encontrado; entretanto, foi confirmada a presença do filotipo I por

Rodriguez (comunicação pessoal). O fato de encontrar diferentes filotipos não é algo inesperado, pois, o fluxo de material vegetal de espécies suscetíveis à *R. solanacearum* torna isso algo possível e deve ser considerado um alerta para as medidas quarentenárias do Brasil, provando a fragilidade dos métodos de detecção e caracterização de determinados fitopatógenos. Filotipos atualmente não apresentam muitas respostas práticas além da correlação com o continente de origem segundo à variações da região do 16S. Analisando isolados mais antigos da coleção, foram encontrados outros que pertencem ao filotipo I, podendo concluir que a entrada desse filotipo no país precede diversos aprimoramentos no sistema quarentenário o qual não pode julgado como falho, já que o ocorrido não é um fato recente.

A literatura confirma que a R3B2 é altamente homogênea geneticamente, como demonstrado por Siri *et al.* (2011) em estudo onde foram caracterizados isolados de R3B2 de batata no Uruguai e através de análises filogenéticas, confirmando a proximidade entre isolados do mundo todo de mesma raça e biovar. Essa uniformidade pode ser vista principalmente pelas sequevares, já que marcadores moleculares para *R. solanacearum* tendem a não permitir correlacionar com nenhuma informação pertinente devido à variabilidade genética elevada, mesmo nas classificações infra-subespecíficas mais abrangentes. A adaptação a condições climáticas e de hospedeira podem ter sido a causa do estreitamento genético dessa população (Stevens & Van Elsas, 2009; Poussier *et al.*; 2000; Van der Wolf *et al.*; 1998), a ponto de todas as epidemias uruguaias serem atribuídas à uma linhagem clonal do patógeno (Siri *et al.*; 2011). A variabilidade de *R. solanacearum* no Brasil é um fator complicador para a fiscalização das fronteiras para evitar a entrada e disseminação de estirpes. Mesmo com grande diversidade do patógeno no país, deve-se lembrar que a entrada de outros filotipos podem reduzir o tempo de uso de cultivares resistentes, assim como desenvolver novas variantes do patógeno gerando maior gama de hospedeiras, ou mesmo agregar outras características de diferentes raças, biovars, filotipos ou sequevares. Atualmente as técnicas, equipamentos e metodologias descritas para detecção e identificação do patógeno se demonstraram eficazes; entretanto, deve-se lembrar que máquinas de PCR em tempo real ainda não estão disponíveis para

todos os laboratórios no país, sendo essas as mais sensíveis e precisas no diagnóstico de uma série de patógenos.



**Figura 8.** Eletroforese em gel de agarose da amplificação por PCR multiplex para identificação dos filotipos de isolados de *Ralstonia solanacearum* incluindo alguns isolados removidos da análise final da dissertação.

Dois isolados deste trabalho geraram discussão sobre divergências entre isolados em níveis inferiores à sequevares/filotipos: RS 93 e RS 95, coletados

de áreas próximas, com espécie de origem igual e ambos de mesma, filotipo, biovar e possivelmente mesma sequevar. Tais características em comum demonstram que a variação destes isolados na capacidade de infectar o gerânio e até mesmo na agressividade, podem ter sido geradas por mutações, que necessitaria de métodos mais refinados de estudo do genoma, possivelmente exigindo o sequenciamento do genoma completo do isolado.

No Brasil são encontrados isolados da R3B2 de ambos os subfenótipos, 2A e 2T; este último por não estar amplamente disseminado, até o momento se conhece muito pouco sobre suas características, estando sua população pobremente caracterizada. Entre os isolados testados, pode-se assumir a existência de isolados 2T na amostra usada no experimento; entretanto, a falta a caracterização do subfenótipo dos isolados utilizados não permite afirmar de que podem sim causar infecções em gerânios. Nos EUA e UE se usam diversos tipo de métodos de detecção de *R. solanacearum*, alguns deles focando na biovar 2A, pecando na abrangência do teste, como testes de ELISA realizados com anticorpos monoclonais ou primers para PCR desenhados para raça 3 biovar 2A. Tais testes com altíssima especificidade podem estar reduzindo as chances de detecção da biovar 2T e aumentando, assim, a possibilidade da disseminação do patógeno para outro países.

O Brasil como exportador de plantas ornamentais, em especial de gerânios, por diversas empresas internacionais que utilizam o nosso clima propício para estas plantas, levanta a necessidade de indexação de lotes produzidos pelas empresas exportadoras, prática até o momento não valorizada devido à ausência do histórico de disseminação do patógeno pelo gerânio produzido no Brasil.

É necessário, para continuar os entendimentos sobre especificidade de hospedeiras, que se intensifiquem estudos de sequenciamento de genoma completo de isolados de *R. solanacearum* em larga escala, para que se possa encontrar quais genes são responsáveis por essa característica e como devemos lidar com essa variabilidade para fins de controle a murcha bacteriana.

## 5. Conclusões

Os isolados brasileiros das raças 1 e 3, biovars 1, 2 e 3, filotipos I e II são capazes de infectar o gerânio comum (*P. hortorum*) e o pendente (*P. peltatum*).

Nem todos isolados da R3B2 foram capazes de afetar o gerânio, exigindo testes mais aprofundados sobre a diferença entre eles.

O gerânio foi menos suscetível à *R. solanacearum*, tendo seu período de incubação (ou período latente) maior que dobro do observado para tomate e batata.

No Brasil encontram-se isolados do filotipo II, típico das Américas e também isolados filotipo I que, segundo a classificação de Fegan e Prior (2005), são originários da Ásia.

As quatro variedades de *P. peltatum* avaliadas demonstraram ser todas suscetíveis aos isolados selecionados de *R. solanacearum*.

Houve diferença nos níveis de resistência entre as variedades, sendo a variedade 332, da Lazzeri®, a com o menor índice de doença.

## 6. Referências Bibliográficas

Almeida, I. M. G.; Destéfano, S. A. L.; Rodrigues Neto, J.; Malavolta Jr, V. A. Murcha bacteriana do gerânio causada por *Ralstonia solanacearum* biovar 2 / Raça 3 no Brasil. Revista de agricultura. v. 78, n.1, p.33, 1999.

Alvarez, B.; Lopez, M. M.; Biosca, E. G. Survival strategies and pathogenicity of *Ralstonia solanacearum* phylotypes II subjected to prolonged starvation in environmental water microcosms. Microbiology. v.154. p. 3590-3598. 2008.

APHIS-PPQ USDA. Action plan for *Ralstonia solanacearum* race 3, biovar 2 found on nurseries facilities. 2003.

APHIS-PPQ USDA. New pest response guidelines. *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2. 2008.

APHIS-PPQ USDA. Recovery plan for *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2. 2006.

Assis, S. M. P.; Mariano, R. R. L.; Gondim, J. R. Menezes, M.; Rosa, R. C. T. Doenças e pragas das helicônias. Recife: UFRPE, 102p. 2002.

Boudazin, G., Le Roux, A.C., Josi, K., Labarre, P., Jouan, B. Design of division specific primers of *Ralstonia solanacearum* and application to the identification of European isolates. *European Journal of Plant Pathology*. v.105, p.373–380. 1999.

Buddenhagen, I. W.; Sequeira, L.; Kelman, A. Designation of races of *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology*. v. 52, p.726. 1962.

Caruso, P.; Bertolini, E.; Cambra, M.; Lopes, M. M. A new and sensitive Co-operational polymerase chain reaction for rapid detection of *Ralstonia solanacearum* in water. *Journal of Microbiological Methods*. v.55. p.257- 272. 2003.

Caruso, P.; Gorris, M.T.; Cambra, M.; Palomo, J.L.; Collar, J.; Lopez, M.M. Enrichment Double-Antibody Sandwich Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay That Uses a Specific Monoclonal antibody for sensitive Detection of *Ralstonia solanacearum* in Asymptomatic Potato Tubers. *Applied and Environmental Microbiology*, v.68, p.3634-3638. 2002.

Ciampi, L.; Sequeira, L. Influence of temperature on virulence of race 3 strains of *Pseudomonas solanacearum*. *Am. Potato J.* v.57, p.307-317. 1980.

Clark, M. F. Immunosorbent assays in plant pathology. *Annu. Rev. Phytopathol.* v.9. p.83–106. 1981.

Cook, D.; Barlow, E.; Sequeira, L. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphism with DNA probes that specify virulence and the hypersensitive response. *Molecular Plant Microbe Interaction*. v.2, p.113-121. 1989.

Cook, D.; Sequeira, L. Strain differentiation of *Pseudomonas solanacearum* by molecular genetic methods. In: Hayward, A.C.; Hartman, L. Bacterial wilt: the disease and its causative agent,

*Pseudomonas solanacearum*. CAB International, Wallingford, United Kingdom. 1994.

Denny, T. P.; Hayward, A. C. Gram-Negative Bacteria – *Ralstonia*. p. 151- 174. In: Schaad. N. W.; Jones, J. B.; Chun, W. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3 ed. APS press. 2001.

Deny, T.; Brumbley, S.; Carney, B.; Clough, S.; Schell, M. Phenotype conversion of *Pseudomonas solanacearum*: its molecular basis and potential function. In: Hayward, A. C.; Hartman, G. L.; Bacterial wilt: The disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. Wallingford: CAB International, p.137-143. 1994.

Dianese, J. C.; Takatsu, A. *Pseudomonas solanacearum* biovar I isolada em eucalipto em Monte Dourado, estado do Pará. Fitopatologia Brasileira. v.10, n.2. p.362. 1985.

Elphinstone, J. G.; Hennessy, J.; Wilson, J. K.; Stead, D. E. Sensitivity of different methods for the detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tuber extracts. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* v.26, p.663-678. 1996.

Elphinstone, J. G. The current bacterial wilt situation: A global overview. In: Allen, C.; Prior, P.; Hayward, A. C. The bacterial wilt: The disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. The American Phytopathological Society, St. Paul. MN. 2005.

Englebrecht, C. Modification of a semi-selective medium for the isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum*. In Bacterial Wilt Newsletter (ed. Hayward, A. C.) 10. 3-5. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra (AU). 1994.

EU PROTOCOLS. COMMISSION DIRECTIVE 2006/63/CE of 14 July 2006. amending Annexes II to VII to Council Directive 98/57/EC on the control of *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*, 2006.

FAO. Ranking of Potato Producers disponível em:  
<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> Acessado 05/05/2010.

Fegan, M.; Holoway, G.; Hayward, A.C.; Timmis, J. 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 Springer Verlag editions, Heidelberg, Germany, p.34– 43.1998.

Fegan, M.; Prior, P. How complex is the *Ralstonia solanacearum* species complex? In: Allen, C.; Prior, P.; Hayward, A. C. Bacterial wilt

disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. p.449-461. APS Press, Minnesota, US. 2005.

Fonteno, C. W. Geraniums. In: Larson, R. A. Introduction to Floriculture. p. 453-475. Academic Press. 1992.

Gachon, C.; Mingam, A.; Charrier, B. Real-time PCR: what relevance to plant studies? *Journal of Experimental Botany*, v.55, n.402, p.1445-1454. 2004.

Garcia, B. S. Diversidade de isolados brasileiros de *Ralstonia solanacearum* da biovar 2. Dissertação de Mestrado. Universidade Católica de Brasília. 2009.

Genin ,S; Boucher, C. A. Lessons learned from the genome analysis of *Ralstonia solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology*. v.42, p.107-134. 2004.

Gorris, M. T. B.; Alarcon, M.; Lopez, M.; Cambra, M. Characterization of monoclonal antibodies specific for *Erwinia carotovora* subsp. *Atroseptica* and comparison of serological methods for its selective detection on potato tubers. *Applied Environmental Microbiology*. v.60, p.2076–2085. 1994.

Graham, J.; Lloyd, A.B. An improved indicator plant method for the detection of *Pseudomonas solanacearum* race 3 in soil. *Plant Dis. Rep.* v.62, p.35– 37.1978.

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

Hayward, A. C. Fruit rots of banana caused by *Ralstonia solanacearum* race 2: question of nomenclature, transmission and control. *InfoMusa* v.15, n.1-2, 2006.

Hayward, A. C.; Sequeira, E. R.; French, H.; Nydegger, U. Tropical variant of biovar 2 of *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology*. v. 82, p.608. 1991.

Hayward, A.C. Biology and epidemiology of a bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology*. v.29, p.65–87. 1991.

Hayward, A.C. *Ralstonia solanacearum*. In: *Encyclopedia of Microbiology* (Ed. by Lederberg, J.), v. 4. San Diego: Academic Press, 32–42. 2000.

Hayward. A. C. The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. p.9-24. In: Hayward, A. C.; Hartman, G. L. *The disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*. EDS. CABI International, United kingdom. 1994.

Hudelson, B. D. Southern bacterial wilt. Garden facts. University of Wisconsin. 1999.

IBRAFLO. Relatório da produção de flores e plantas ornamentais no Brasil. FloraBrasilis, programa setorial integrado de exportação de flores e plantas ornamentais. 45 p. 2002.

Imazaki, I.; Nakaho, K. Pyruvate-amended modified SMSA medium: improved sensitivity for detection of *Ralstonia solanacearum*. J Gen Plant Pathol. v.76, p.52–61. 2010.

Janse, J. D. A detection method for *Pseudomonas solanacearum* in symptomless potato tubers and some data on its sensitivity and specificity. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* v.18, p.343-351. 1988.

Janse, J. D. Potato brown rot in western Europe: History, present occurrence and some remarks on possible origin, epidemiology and control strategies. EPPO Bull. v.26 p.679-695. 1996.

Janse, J. D.; Van den Beld, H. E.; Elphinstone, J.; Simpkins, S.; Sin, T. T.; Vaerenbergh, J. Introduction to Europe of *Ralstonia solanacearum* biovar 2, race 3 in *Pelargonium zonale* cuttings. *Journal of Plant Pathology*. v.86 (2), p. 147-155. 2004.

Jeong, Y.; Kim, J.; Kang, Y.; Lee, S.; Hwang, I. Genetic diversity and distribution of Korean isolates of *Ralstonia solanacearum*. *Plant Disease* v.91, p.1277-1287. 2007.

Ji, P.; Allen, C.; Sanchez-Perez, A.; Jones, J.; Momol, T. New diversity and diagnostic challenges associated with *Ralstonia solanacearum* strains in Florida. *Plant Disease*. V. 91. p. 195-203. 2007

Kelman, A. The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. A literature review and bibliography. N. C. Agric. Exp. Stn. Tech. Bull. No. 99. 1953.

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

Lambert, C. D.; Agricultural Bioterrorism Protection Act of 2002: Possession, Use, and Transfer of Biological; Agents and Toxins; Interim and Final Rule . (7 CFR Part 331). *Federal Register* 67:76908-76938. 2002.

Lebeau, A.; Dauay, M. C.; Frary, A.; Palloix, A.; Wang, J. F.; Dintinger, J.; Chiroleu, F.; Wicker, E.; Prior, P. Bacterial Wilt Resistance in Tomato, Pepper, ad Eggplant: Genetic Resources Respond to Diverse Strains in the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. *Phytopathology*. v. 101, p. 154-165. 2011

Llop, P.; Bonaterra, A.; Peñalver, J.; Lopez, M.M. Development of highly sensitive nested-PCR procedure using a single closed tube for detection of *Erwinia amylovora* in asymptomatic plant material. *Applied Environmental Microbiology*. v.66, p.2071–2078. 2000.

Lopes, C. A.; Poltronieri, L. S.; Albuquerque, F. C.; Trindade, D. R.; Murcha-bacteriana em pimenta longa. *Horticultura Brasileira*. v.15. supl. 1997.

Lopes, C. A.; Poltronieri, L. S.; Quezado-Soares, A. M.; Trindade, D. R.; Albuquerque, F. C. Maracujazeiro, mais um hospedeiro de *Ralstonia solanacearum*. *Summa Phytopathologica*. v.25. n.1. p. 26. 1999.

Lopes, C.A. Murchadeira da Batata. 65 p. ABBA. Embrapa Hortaliças. 2005.

Lopez, M. M.; Gorris, M. T.; Llop, J.; Cubero, J.; Vicedo, B.; Cambra, M. Selective enrichment improves isolation, serological and molecular detection of plant pathogenic bacteria, p. 117–121. *In* H.-W. Dehne, G. Adam, M. Diekmann, J. Frahm, A. Mauler-Machnik, and P. van Halteren (ed.), *Diagnosis and identification of plant pathogens*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 1997.

Lopez, M. M.; Llop, J.; Cubero, R.; Peñalver, P.; Caruso, E.; Bertolini, M.; Gorris, T.; Cambra, M. Strategies for improving serological and molecular detection of plant pathogenic bacteria, p. 83–87. *In* S. H. De Boer(ed.), *Proceedings of the 10th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*, Charlottetown, Canada. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 2000.

Lozano, J. C.; Sequeira, L. Differentiation of races of *Pseudomonas solanacearum* by a leaf infiltration technique. *Phytopathology* v.60, p.833-838.1969.

Mahuku, G. S. A simple extraction method suitable for PCR-Based analysis of plant, fungal and bacterial DNA. *Plant Molecular Biology Society Reporter*. v.22. p.71-81. 2004.

Malavolta Jr, V. A.; Beriam, L. O. S.; Almeida, I. M. G.; Rodrigues Neto, J.; Robbs, C. F. Bactérias fitopatogênicas assinaladas no Brasil: uma atualização. *Suma Phytopathologica*. v.34, suplemento especial. 88 p. 2008.

Marco-Noales, E.; Bertolini, C.; Lopez, M. M. Integrated approach for detection of nonculturable cells of *Ralstonia solanacearum* in asymptomatic *Pelargonium* spp. Cuttings. *Phytopathology*. V.8. n.8. p. 949-955. 2008.

McCarter, S.M.; Dukes, P.D.; Jaworski, C.A. Vertical distribution of *Pseudomonas solanacearum* in several soils. *Phytopathology* v.59, p.1675–1677. 1969.

Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs. Pest alert: a new race of bacterial wilt threatens tomatoes. [www.gov.on.ca/OMAFRA/english](http://www.gov.on.ca/OMAFRA/english). (consultado em 22 de dezembro de 2011).

Norman, D. J.; Huang, Q.; Yuen, J. M. F.; Mangravita-Novo, A.; Byrne, D. Suscetibility of geranium cultivars to *Ralstonia solanacearum*. *Hortscience*. v. 44, p.1504-1508. 2009.

Norman, D. J.; Zapata, M.; Gabriel, D. W.; Duan, Y. P.; Yuen, J. M. F.; Mangravita-Novo, A.; Donahoo, R. S. Genetic Diversity and Host Range Variation of *Ralstonia solanacearum* Strains Entering North America. *Phytopathology*. v. 99. n.9. p 1070-1077. 2009.

Olmos, A.; Bertolini, E.; Cambra, M. Simultaneous and Cooperational amplification (Co-PCR): a new concept for detection of plant viruses. *Journal of Virology Methods*. v.106. p.15–23. 2002.

Olson, K. Experiences on brown rot caused by *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith in Sweden. *Bull. OEPP* 6: 199-207.1976.

Opina, N.; Tavner, F.; Holloway, G.; Wang, J. F.; Li, T.H.; Maghirang, R.; Fegan, M.; Hayward, A.C.; Krishnapillai, V.; Hong, W.F.; Holloway, B.W.; Timmis, J. N.; A novel method for development of species and strain-specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). *Asia Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol.*v.5, p.19–33. 1997.

Pastrik, K.H.; Maiss, E. Detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tubers by polymerase chain reaction. *Journal of Phytopathology*. v.148, p.619– 626. 2000.

Pereira, A. S.; Daniels, J. O cultivo da Batata na região Sul do Brasil. *Embrapa Informação Tecnológica*. 567 p. 2003.

Pinheiro, C.; Amorim, J. A. E.; Diniz, L. E. C.; Silva, A. M. F.; Talamini, V.; Souza Júnior, M. T. Diversidade genética de isolados de *Ralstonia solanacearum* e caracterização molecular quanto a filotipos e sequevares. *Pesquisa agropecuária brasileira*, v.46. p.593-602. 2011.

Poussier, S.; Luisetti, J. Specific detection of biovars of *Ralstonia solanacearum* in plant tissue by nested PCR. *European Journal of Plant Pathology*. v.106, p.255–265. 2000.

Poussier, S.; Trigalet-Demery, D.; Vandewalle, P.; Goffinet, B.; Luisetti, J.; Trigalet, A. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* as assessed by PCR-

RFLP of the *hrp* gene region, AFLP and 16S rRNA sequence analysis, and identification of an African subdivision. *Microbiology* v. 146. p.1679-1692. 2000

Robbs, C. F. O “Moko” da bananeira e outras bacterioses de cultivos tropicais. *Fitopatologia Brasileira*. v.8, n.3, p.534-535. 1983.

Rodrigues, E. A. Diversidad de *Ralstonia solanacearum* em Brasil. Relatório de Pós-doutorado. Embrapa Hortaliças, CNPH. Financiado pela Capes. Supervisor: Lopes, C. A. 2009.

Schnerr H.; Niessen L.; Vogel RF. Real time detection of the *tri5* gene in *Fusarium* species by LightCycler™-PCR using SYBR<sub>2</sub>-Green I for continuous fluorescence monitoring. *International Journal of Food Microbiology* v.71, p.53–61. 2001.

Seal, S.E.; Jakson, L.A.; Young, J.P.W.; Daniels, M.J. Differentiation of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas pickettii*, and blood disease bacterium by partial 16S sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. *J. Gen. Microbiol.* v.139, p.1587– 1594. 1993.

Siri, M. I.; Sanabria, A.; Pianzola, M. J. Genetic diversity and aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* strains causing bacterial wilt of potato in Uruguay. *Plant Disease*. v.95. n.10. p.1292-1301. 2011.

Smith, J. J.; Waage, J.; Woodhall, J. W.; Bishop. S. J.; Spence, N. S. The challenge of providing plant pest diagnostic services for Africa. *European Journal of Plant Pathology*. v.121, p.365-375. 2008.

Stanford, E. E.; Wolf, F. A. Studies on *Bacterium solanacearum*. *Phytopathology*, v.7. p.155-165. 1917.

Stevens, P.; Van Elsas, J. D. Genetic and phenotypic diversity of *Ralstonia solanacearum* biovar strains obtained from Dutch waterways. *Antonie Leeuwenhoek* v.97. p.171-188. 2009.

Strider, D. L.; Jones, R. K.; Haygood, R. A.; Southern bacterial wilt of geranium caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Plant Disease*. v. 65. p.52-53. 1981.

Swanson, J. K.; Montes, L.; Mejia, L.; Allen. C. Detection of latent infections of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 in geranium. *Plant Disease*. v.91, n.7, 2007.

Swanson, J. K.; Yao, J.; Tans-Kerstn, J.; Allen, C. Behavior of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 during latent and active infections of geranium. *Phytopathology*. v.95, p.136-143. 2005.

Takatsu, A.; Lopes, C. A.; Murcha-bacteriana em hortaliças: avanços científicos e perspectivas de controle. *Horticultura Brasileira*, v.15, p.170-177. 1997.

Van der Wolf, J. M.; Bonants, P. J. M.; Smith, J. J.; Hagenaar M., Nijhuis, E.; van Beckhoven, J. R. C. M.; Sadder, G. S.; Trigalet, A.; Feuillade, R. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* Race 3 in Western Europe determined by AFLP, RC-PFGE and Rep-PCR. Pages 44-49 in: Prior, P; Allen, C.; Elphinstone, J. *Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects*. eds. Springer-Verlag, New York. 1998.

Von Parseval, M. Uma doença do fumo e da batata inglesa no município de Santa Cruz. Instituto Borges Medeiros (Porto Alegre). *Boletim* 1. 15p. 1922.

Wang J. F., Hanson P, Barnes J. A. Worldwide evaluation of an international set of resistance sources to bacterial wilt in tomato. In: Prior P, Allen C, Elphinstone J, editors. *Bacterial wilt disease. Molecular and ecological aspects. Second international bacterial wilt symposium, Gossier, Guadeloupe, France, 22–27 June 1997*. Germany: Springer. p. 269–79. 1998.

Weller, S.A., Elphinstone, J.G., Smith, N.C., Boonham, N., Stead, D.E., 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Applied Environmental Microbiology* v.66, p.2853– 2858. 2000.

Wicker, E.; Grassart, L.; Corason-Beaudu, R.; Mian, D.; Guilbaud, C.; Fegan, M.; Prior, P. *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) Exhibiting a new pathogenic potencial. *Applied and environmental microbiology*, v. 73, n. 21, p. 6790-6801. 2007.

Williamson, L., Hudelson, B. D.; Allen, C. *Ralstonia solanacearum* strains isolated from geranium belongs to race 3 and are pathogenic to potato. *Plant Disease*. V. 86. p. 987-991. 2002.

Wolf, J. M.; Boer, S. H. Bacterial pathogens of potato. In: *Potato biology and biotechnology*. 2007.

Wurmbach E.; Yuen T.; Sealfon S. C. Focused microarray analysis. *Methods* v.31, p.306–316. 2003.

Yabuuchi, E.; Kosako, Y.; Yano, I.; Hotta, H.; and Nishiuchi, Y. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* General 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. *Microbiol. Immunol.* v.39, p.897–904. 1995.