



CASSIA RENATA PINHEIRO

ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE
***Ralstonia solanacearum* raça 2, NO BRASIL**

LAVRAS - MG

2010

CASSIA RENATA PINHEIRO

**ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Ralstonia solanacearum*
raça 2, NO BRASIL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Manoel Teixeira Souza Júnior

LAVRAS - MG

2010

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Pinheiro, Cassia Renata.

Estudo da diversidade genética de *Ralstonia solanacearum* raça
2 no Brasil / Cassia Renata Pinheiro. – Lavras : UFLA, 2010.
61 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.
Orientador: Manoel Teixeira Souza Júnior.
Bibliografia.

1. Banana. 2. Murcha bacteriana. 3. Variabilidade. 4. Sequevar.
5. Filotipo. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 589.90873282

CASSIA RENATA PINHEIRO

**ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Ralstonia solanacearum*
raça 2, NO BRASIL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 30 de julho de 2010.

Dr. Leandro Eugenio Cardamone Diniz EMBRAPA

Dra. Viviane Talamini EMBRAPA

Dr. Manoel Teixeira Souza Júnior
Orientador

LAVRAS – MG

2010

*À minha linda família,
Mãezinha, Maria Pinheiro e meu
Paizinho, Raimundo Pinheiro, meus
irmãos Marcos, Catia e Lilian, minhas
lindas princesinhas Patrícia e Luana,
meus príncipes Yago e Ryan e minha
Titia Ercília pelo amor incondicional e
apoio em todos os momentos! Amo
demais!*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À *Deus* por iluminar o meu caminho e fortalecer-me nos momentos difíceis, por atender a todas as minhas orações e perdoar o atraso no pagamento de todas as promessas;

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Biotecnologia Vegetal, pela oportunidade de realização do curso de Pós-Graduação em Biotecnologia vegetal;

À CAPES pela concessão de bolsa de estudo;

Ao Dr. Leandro Diniz, exemplo de competência e profissionalismo, por ter compartilhado comigo seus conhecimentos e participado de forma essencial na execução deste trabalho;

Ao Dr. Manoel T. Souza Júnior, pelo apoio na condução das pesquisas e pela disponibilidade na etapa final;

À Dra. Viviane Talamini, pela disponibilidade e atenção;

Ao Dr. Miguel A. D. Rodríguez, pelo auxílio e sugestões;

Ao Dr. Adriano Márcio, por seus ensinamentos e sugestões fundamentais para a compreensão deste estudo;

À Dra. Ana Veruska, Dr. Evandro Muniz, Aninha e Marcela, pelo sorriso amigo e por mostrar que existe 'vida' além da pesquisa científica;

Em especial à super amiga Julie Anne, por se fazer presente em todos os momentos, sempre companheira e prestativa, compartilhando lágrimas e sorrisos, sem a qual não seria possível a conclusão de nenhuma etapa deste estudo.

À equipe do Laboratório de Biologia Molecular CPATC: Camila, Tatiana, Gilvania, Lucas, Luciana, Karla, Grasiela, Katily, Vanice, Sílvio e Luzia pela grande ajuda na condução do trabalho e alegria do convívio diário;

Ao amigo Vivizinho, por ser tão prestativo e confiante (pelas bandas que foi obrigado a contar também);

À equipe do Laboratório de Fitopatologia: Rejane, Carol, Rosana e Nataly, pelo apoio na condução das pesquisas;

À equipe do Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Agroindústria Tropical, ao Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM-UFLA), do Laboratório de Fitovirologia (UFLA), e do Laboratório de Biologia Molecular da UFS por se disponibilizarem durante o experimento;

Aos amigos especiais do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal: Daniele, Luciana, Romário, Nádia, Brenda, Gustavo, Kátia, Fabiana e Glacy por me socorrem nas dúvidas, compartilharem as angústias e sempre me acolherem com carinho;

Às lindas amigas Mirele, Lydia, Gislene, Liliane e Joyce, pelo otimismo e pensamento sempre positivo;

Ao Davi Aquino pela confiança e estímulo;

Aos Alelo, Clodoalda e Sebastião pelo companheirismo e por me mostrarem que não devo cuidar de nenhuma forma de vida sozinha;

E a todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO GERAL

Ralstonia solanacearum é um fitopatógeno devastador com extensa distribuição geográfica e ampla gama de hospedeiros. Este patógeno é causador da murcha bacteriana em mais de 50 famílias botânicas. É considerada uma espécie complexa e altamente heterogênea e tem sido dividida em cinco raças, de acordo com a gama de hospedeiros, e cinco biovars, de acordo com a utilização de três açúcares e três álcoois como fonte única de carbono. Devido a sua heterogeneidade, tem sido definida como um complexo de espécies e classificada em quatro níveis taxonômicos, sendo espécie, filotipo, sequevar e clone. Na cultura da banana, *R. solanacearum* raça 2 é o agente causal do moko-da-bananeira; doença vascular que pode atingir todos os órgãos vegetais, em diferentes estádios de desenvolvimento. Até o momento não existem medidas de controle eficientes ou variedades resistentes, sendo que o potencial de dano às plantações de bananeira é enorme, podendo chegar até a 100% em condições favoráveis. A caracterização de populações bacterianas de diferentes regiões geográficas, por meio de técnicas modernas de biologia molecular, tem sido utilizada para acessar a diversidade intra-específica e proporcionar o direcionamento de estratégias de controle além de orientar programas de melhoramento genético; entretanto, poucos resultados têm sido registrados para o moko-da-bananeira. Esta revisão teve o objetivo de fazer um levantamento bibliográfico de trabalhos realizados nos últimos dez anos com *R. solanacearum* raça 2 para conhecer o patógeno e conduzir estratégias que pudessem auxiliar no estudo da diversidade de isolados brasileiros. A sumarização dessas publicações evidenciou poucos trabalhos realizados com isolados brasileiros, sendo que não foi encontrado nenhum trabalho que tenha sido direcionado à caracterização de isolados provenientes de plantas de bananeira, validando a importância de se efetuar a caracterização molecular de isolados brasileiros provenientes de plantas de bananeira, por meio do estudo da diversidade desse patógeno.

Palavras-chave: Banana. Murcha bacteriana. Variabilidade. Sequevar. Filotipo.

GENERAL ABSTRACT

Ralstonia solanacearum is a devastating plant pathogen with an extensive geographic distribution and wide host range. This pathogen is causing bacterial wilt in more than 50 families. It is considered a species complex and highly heterogeneous and has been divided into five races according to host range and five biovars, according to the use of three sugars and three alcohols as carbon source. Due to its heterogeneity it has been defined as a complex of species and classified into four taxonomic levels: species, phylotypes, sequevar, and clone. In banana, *Ralstonia solanacearum* race 2 is the causal agent of the disease named “moko”. Moko is a vascular disease that can strike all plant organs in different developmental stages. So far there are no efficient control measures, and the potential damage to banana plantations is enormous, reaching up to 100% in favorable conditions. The characterization of bacterial populations occurring in different geographic regions, using modern techniques of molecular biology, has been used to assess the intra-specific diversity and provide guidance for the development of control strategies in addition to guide breeding programs. However, few results have been registered so far. This review aimed to describe the research done in the last ten years with *R. solanacearum* race 2, regarding the pathogen and the strategies that could help in studying the diversity of Brazilian strains. In summary, these publications revealed few studies with Brazilian isolates, and did not find any work that was directed to characterization of isolates from banana plants, validating the importance of performing molecular characterization of Brazilian isolates from banana plants through the study of diversity of this pathogen.

Keywords: Banana. Bacterial wilt. Variability. Sequevar. Phylotypes.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 Revisão - <i>Ralstonia solanacearum</i> raça 2, agente causal do “moko-da-bananeira”	10
1	INTRODUÇÃO GERAL	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	A cultura da banana	13
2.2	O moko-da-bananeira	14
2.3	A bactéria <i>Ralstonia solanacearum</i>	16
2.3.1	Caracterização de <i>Ralstonia solanacearum</i>	17
	REFERÊNCIAS	26
	CAPÍTULO 2 Análise da diversidade genética de <i>Ralstonia solanacearum</i> raça 2, agente causal do “moko-da-bananeira”, no Brasil	30
1	INTRODUÇÃO	33
2	MATERIAL E MÉTODOS	36
2.1	Isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i>	36
2.2	Certificação da espécie & Determinação dos filotipos e sequevares	39
2.3	Caracterização utilizando rep-PCR e RAPD	39
2.4	Análise dos dados	40
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
3.1	Certificação da espécie & Determinação dos filotipos e sequevares	41
3.2	Caracterização utilizando rep-PCR	45
3.3	Caracterização utilizando RAPD	52
4	CONCLUSÕES	54
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
	REFERÊNCIAS	57

CAPITULO 1

Revisão - *Ralstonia solanacearum* raça 2, agente causal do “moko-da-bananeira”.

1 INTRODUÇÃO GERAL

O agente etiológico do moko-da-bananeira é a bactéria *Ralstonia solanacearum* raça 2, que está distribuída nas regiões tropicais e subtropicais, estendendo sua disseminação nas regiões temperadas européias e norte americanas (GENIN; BOUCHER, 2004). Em território brasileiro, sua primeira constatação foi em 1976, no estado do Amapá e atualmente é considerada praga quarentenária A2, restrita aos estados do Amapá, Amazonas, Pará, Pernambuco, Rondônia, Roraima e Sergipe.

O moko-da-bananeira atualmente é considerado grande ameaça nas principais regiões produtoras de banana, onde se incluem o Vale do Ribeira (SP), Vale do Açu (RN), norte de Minas Gerais e de Santa Catarina e Petrolina (PE), em função dos riscos que sua introdução e disseminação representam para a bananicultura brasileira.

Devido a sua ampla distribuição geográfica e aos danos causados no cultivo da banana, *R. solanacearum* é objeto de diversos estudos em várias partes do mundo. No Brasil, apesar da grande importância sócio-econômica da cultura da banana e da situação quarentenária dessa doença, não se encontra disponível nenhum estudo filogenético focado na raça 2 que incide na cultura da banana.

A partir do exposto, uma proposta inicial de trabalho foi elaborada com o objetivo principal de caracterizar a diversidade genética de isolados de *R. solanacearum* obtidos de bananeiras sintomáticas para moko-da-bananeira no Estado de Sergipe e, se possível, iniciar o desenvolvimento de sistema de diagnose molecular específico para *R. solanacearum* raça 2, agente causal do moko-da-bananeira. Para que esses objetivos fossem alcançados a primeira etapa consistiu de um levantamento bibliográfico sobre *R. solanacearum* com foco em genômica, diversidade, diagnose molecular, e na raça 2, que incide na cultura da

bananeira, esse levantamento originou o capítulo 2 dessa dissertação de mestrado e orientou as estratégias utilizadas para estudo da diversidade genética do patógeno.

Para o estudo da diversidade genética foi proposto a construção de uma coleção biológica de isolados de *R. solanacearum* obtidos de bananeira sintomáticas no Estado de Sergipe em conjunto com isolados que incidem em outras espécies vegetais, sendo esses isolados estabelecidos como coleção de referência para fins comparativos.

Devido à baixa incidência da doença no ano de 2010 no estado de Sergipe, a coleção foi ampliada para mais estados brasileiros, incluindo cepas de *R. solanacearum* raça 2 presentes nos estados do Amazonas, Pará, Pernambuco e Sergipe e da raça 1 isolados nos estados do Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Amazonas. Essa ampliação viabilizou um estudo mais completo, do ponto de vista de país, em contraposição a proposta inicial que era restrita a um único Estado da Federação.

Para a construção dessa coleção biológica, denominada CPATC, foram obtidos 14 isolados do IB-SBF (Instituto Biológico - Seção de Bactérias Fitopatogênicas), 18 do INPA (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia), 12 do CPAA (Centro de Pesquisa Amazônia Ocidental), oito isolados do CNPH (Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças) e quatro da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Na coleção também foram incluídos 11 isolados obtidos de material vegetal coletado em inspeções realizadas pela EMDAGRO e MAPA, no estado de Sergipe. Destes, totalizando 67 isolados, foi possível o resgate e purificação de 33, sendo 19 pertencentes à raça 2 (15 isolados de banana e 4 de helicônia) e 14 pertencentes à raça 1, sendo neste estudo usados como uma coleção de referência para fins comparativos.

Após construção da coleção foi possível alcançar o objetivo de estudar a diversidade genética dos isolados brasileiros de *R. solanacearum*, focalizando os

que incidem na cultura da banana. Para esses estudos, foram utilizados os seguintes tipos de marcadores moleculares: RAPD e rep-PCR. Esse estudo possibilitou a geração de um amplo volume de informações sobre os isolados brasileiros patogênicos em banana desconhecido até o momento. Entretanto, o objetivo de gerar um sistema específico de diagnose molecular em plantas assintomáticas não foi estabelecido. A razão para isso foi a ausência de identificação de um marcador específico da raça 2 de *R. solanacearum* que pudesse ser utilizado para o desenvolvimento de sistema de diagnose molecular específico para a mesma.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A cultura da Banana

A bananeira (*Musa* spp. L.) é uma fruteira cultivada em mais de 120 países e que se destaca no contexto socioeconômico pelo alto valor nutritivo e comercial de seus frutos, associado ao seu baixo custo. A produção mundial de banana está em torno de 85.855.856 toneladas, sendo o Brasil o quarto maior produtor com 6.972.000 t, atrás apenas da Índia (21.766.400 t), China (7.325.000 t) e Filipinas (7.000.073 t) (ANUÁRIO DA AGRICULTURA BRASILEIRA - AGRIANUAL, 2009). No Brasil, o cultivo de banana está entre as atividades de maior importância na fruticultura, possuindo mais de 500 mil hectares plantados, justificados pela simplicidade, custo de implantação, manejo, ciclo e vida útil, em comparação às outras frutíferas.

Apesar de sua importância, essa cultura tem sido fortemente ameaçada durante seu desenvolvimento por mais de 20 tipos de doenças, sejam de etiologia fúngica, viral, nemátoda ou bacteriana (ZAMBOLIM L., 2002). No Brasil, dentre essas doenças, as consideradas mais importantes são as sigatokas

amarela e negra (causadas respectivamente pelos fungos *Mycosphaerella musicola* Leach e *M. fijiensis* Morelet), o mal-do-panamá (causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* Snyder e Hansen), e o moko-da-bananeira. Até o presente momento, não existem variedades resistentes ao moko-da-bananeira disponíveis, o que demanda a tomada de medidas de exclusão, que visam impedir que a doença atinja novas áreas (AGRIOS, 2005). Seu potencial de dano às plantações de bananeira pode chegar a 100% de perdas, em condições favoráveis à doença.

2.2 O moko-da-bananeira

O moko-da-bananeira, também conhecido como murcha bacteriana, tem como agente causal a bactéria *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. (1995) raça 2, e é considerada uma das doenças mais importantes de origem bacteriana no mundo, devido às características do patossistema e a severidade dos danos causados.

Está presente em vários países como: Belize, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Equador, El Salvador, Granada, Guatemala, Guiana, Honduras, Jamaica, México, Nicarágua, Panamá, Peru, Suriname, Trinidad e Tobago, EUA e Venezuela nas Américas; Etiópia, Líbia, Malawi, Nigéria e Senegal na África, além da Índia, Filipinas, Indonésia, Malásia, Tailândia e Vietnã na Ásia (THE ORAL ENGLISH PROFICIENCY PROGRAM – OEPP / EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION - EPPO, 2006). Sua constatação em território brasileiro ocorreu em 1976, no Estado do Amapá (TOKESHI; DUARTE, 1976); e em 1987 em Sergipe. Atualmente é considerada praga quarentenária A2, restrita aos estados do Amapá, Amazonas, Pará, Pernambuco, Rondônia, Roraima e Sergipe - MAPA - Instrução Normativa Nº 52, de 20 de novembro de 2007 (BRASIL, 2007).

Os sintomas do moko-da-bananeira são distinguíveis pela murcha das plantas em qualquer fase do ciclo vegetativo, descoloração vascular centralizada no pseudocaule, exsudação de pus bacteriano em testes de copo e em alguns locais é possível observar o amarelecimento de frutos em cachos imaturos (Figura 1). Em plantas jovens a sintomatologia caracteriza-se pela má formação, necrose e murcha da folha cartucho ou vela, seguidos de amarelecimento das folhas baixas. Em plantas adultas, ocorre amarelecimento das folhas basais e murcha das folhas mais jovens, progredindo para as folhas mais velhas. Em solos férteis, com bom teor de umidade, ocorre quebra dos pecíolos junto ao pseudocaule (AGRIOS, 2005).

Ralstonia solanacearum invade os tecidos vasculares da planta através de ferimentos nas raízes e coloniza o córtex radicular em menos de 4 horas. Após dois a três dias o córtex já está completamente colonizado, juntamente com o parênquima vascular e os vasos do xilema, com a bactéria propagando-se por toda planta.

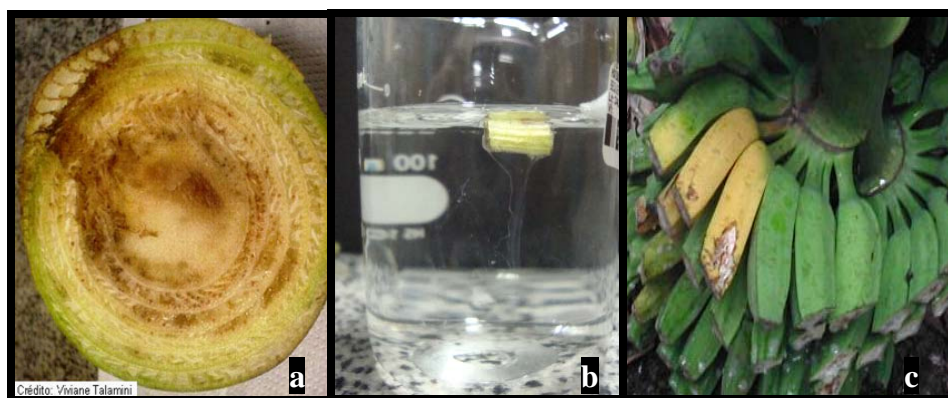


Figura 1 Sintomatologia do moko-da-bananeira. (a) descoloração vascular centralizada; (b) exsudação de pus - bacteriano em teste de copo e (c) amarelecimento de frutos em cachos imaturos (Fotos: (a) V. Talamini (b) C. Pinheiro (2009) e (c) M. Mendonça (2008))

O crescimento bacteriano e a produção de exopolissacarídeo (EPS), considerado o principal fator de virulência desse patógeno, interrompem o fluxo de água das raízes às folhas, resultando na murcha da planta por estresse hídrico. A severidade do ataque depende da susceptibilidade da planta, da virulência das estirpes e de fatores ambientais favoráveis ao desenvolvimento do patógeno. A presença de *R. solanacearum* no xilema indica que o movimento da bactéria ocorre através do fluxo de água (GONZÁLEZ et al., 2009).

A detecção precoce da doença e a rápida erradicação das plantas infectadas, com o uso de herbicidas, podem garantir o convívio com a doença, mantendo-a em baixa percentagem de incidência. Entretanto não se encontra disponível, até o momento, um sistema de detecção de *R. solanacearum* em plantas assintomáticas, sendo então necessário um esquema de inspeção de cada planta por pessoas qualificadas e repetido a intervalos regulares, variando de acordo com o grau de incidência da doença, do histórico de infecção da região e dos tratamentos culturais implantados pelos produtores (NOGUEIRA, 2005).

2.3 A bactéria *Ralstonia solanacearum*

Ralstonia solanacearum é o agente causal da murcha bacteriana, doença vascular que incide em diversas espécies de plantas pertencentes a mais de 54 famílias botânicas, incluindo culturas de alto valor econômico, dentre elas os grupos das solanáceas e musáceas. Foi descrito pela primeira vez por Smith (1896), como *Bacillus solanacearum* Smith e desde então recebeu diferentes denominações. Em 1914 passou a ser chamado de *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith, e em 1992 Yabuuchi e colaboradores propuseram um novo gênero, *Burkholderia*, para o qual transferiram sete espécies do gênero *Pseudomonas*, dentre elas *P. solanacearum*, que passou a ser denominada de *Burkholderia solanacearum* (Smith) (YABUUCHI et al., 1992). Atualmente é

classificada no gênero *Ralstonia* que abrange as espécies *R. pickettii* e *R. solanacearum*, pertencente ao reino Procariotae, divisão Bactéria, classe Proteobacteria, subclasse b-Proteobacteria, ordem Burkholderiales, família Burkholderiaceae. Essa nova classificação foi aceita e validada pela *International Journal of Systematic Bacteriology* - IJSB (YABUUCHI et al., 1995).

A bactéria *R. solanacearum* é Gram negativa, com formato de bastonetes retos ou levemente curvos, medindo 0,5-1,0 x 1,5-4 micrômetros, não esporogênica, móvel por meio de um ou mais flagelos polares, aeróbia estrita e faz parte do grupo das não fluorescentes, que não crescem a 40°C. Tendo seu crescimento em temperaturas entre 25 a 35°C com ótimo em 28°C (AGRIOS, 2005).

2.3.1 Caracterização de *Ralstonia solanacearum*

Ralstonia solanacearum é classificada em raças, filotipos e biovars. O conhecimento das estirpes é grande aliado na orientação de estratégias de manejo e controle da doença.

a) Caracterização Fenotípica

Kelman (1953) observou que, quanto à morfologia, diferentes tipos de colônias poderiam ser observados em *R. solanacearum*: as consideradas normais, cujas colônias são lisas, fluidas, irregularmente arredondadas e opacas; e as mutantes representadas por colônias redondas, translúcidas, rugosas e não fluidas. Observou ainda que em meio contendo uma solução de cloridrato de trifênil tetrazólio (TZC), as colônias normais virulentas são lisas, fluidas,

irregularmente arredondadas, brancas ou levemente avermelhadas no centro da colônia e as não patogênicas, completamente vermelhas.

Tradicionalmente, *R. solanacearum* pode ser classificada em cinco biovars, com base na utilização de três açúcares (lactose, maltose e celobiose) e três álcoois (manitol, sorbitol e dulcitol) (HAYWARD, 1964), como fonte única de carbono e em cinco raças de acordo com a gama de hospedeiros que afeta (AGRIOS, 2005), sendo que a raça 1 (biovars 1, 3 e 4) incide em um grande número de plantas, incluindo batata, tomate, fumo e solanáceas em geral. A raça 2 (biovars 1, 3 e 4) é patogênica em banana e helicônia. A raça 3 (biovar 2) é considerada específica de batata, mas está associada a algumas solanáceas. A raça 4 (biovar 4) incide em gengibre e a raça 5, em amora (HAYWARD, 1964).

b) Caracterização Molecular

Salanoubat et al. (2002) apresentaram o sequenciamento completo do genoma de *R. solanacearum*, estirpe GMI1000, raça 1, isolada de tomate. A estrutura genômica de *R. solanacearum* se subdivide em duas moléculas circulares, denominadas cromossomo e megaplasma (Tabela 1). No cromossomo estão os genes necessários para sobrevivência da bactéria, como por exemplo, os genes envolvidos nos processos de replicação e divisão celular; e no megaplasma encontram-se os genes que conferem características adicionais aos isolados, como adaptação e patogenicidade. Coenye e Vandamme (2003) testaram a hipótese de aquisição dos genes do megaplasma por transferência horizontal contra a hipótese de um ancestral comum utilizando a comparação de sequências simples repetitivas (SSRs) entre ambos os replicons. Com esse estudo concluíram que ambos os replicons tinham um histórico evolutivo similar que sugeria que o megaplasma não havia sido adquirido de

outro organismo, e sim sendo parte de um mesmo ancestral do cromossomo de *R. solanacearum*.

Tabela 1 Características gerais do genoma de *Ralstonia solanacearum*

Característica Genômica	Cromossomo	Megaplasmídeo	Genoma
Comprimento (pb)	3.716.413	2.094.509	5.810.922
Taxa C + G (%)	67,04	66,86	66,97
Genes que codificam proteínas	3.448	1.681	5.129
Genes desconhecidos (%)	12,6	18,7	14,6
Genes regulatórios (%)	7,2	9,6	8
Genes com função definida	1.609	652	2.261

Fonte: Salanoubat et al. (2002)

O sequenciamento completo do genoma de *R. solanacearum* (SALANOUBAT et al., 2002) também possibilitou a identificação de novos genes envolvidos na patogenicidade incluindo genes relacionados à degradação da parede celular vegetal, hormônios de plantas, moléculas sinalizadoras, resistência ao estresse oxidativo, produção de toxinas e antibióticos, entre outros. O genoma de *R. solanacearum* é rico em fatores de ligação, funcionando como determinantes para a ampla gama de hospedeiros. Nesse mesmo estudo, Salanoubat e companheiros fizeram a comparação entre os proteomas de *R. solanacearum* com *Pseudomonas aeruginosa* e *Sinorhizobium meliloti*, por serem espécies que apresentam características semelhantes a *R. solanacearum* como interação com hospedeiros eucarióticos e vida livre no solo. Foi encontrada maior homologia do proteoma de *R. solanacearum* com o proteoma de *P. aeruginosa*, resultado consistente com a evolução das respostas adaptativas às mudanças no ambiente que permitiu que as bactérias se direcionassem para nichos ecológicos diferentes.

A evolução dos genomas bacterianos é beneficiada pelo seu constante fluxo gênico que tem como mecanismo principal, a transferência horizontal de genes, uma importante ferramenta na adaptação de procariotos a um nicho específico, pois a aquisição de um conjunto gênico já preparado e melhorado aumenta a adaptabilidade desses organismos (LAWRENCE, 2002). Ilhas genômicas são as mais fortes evidências de transferência horizontal de genes, onde os mesmos genes estão presentes em organismos distintos. Essas ilhas são classificadas de acordo com as atividades desenvolvidas pelo cluster gênico adquirido, como por exemplo: as ilhas de patogenicidade que podem codificar toxinas ou componentes do sistema de secreção do tipo III. Dessa forma, muitos estudos têm se voltado para a compreensão da complexidade molecular das vias de patogenicidade e na capacidade de rápida adaptação desse organismo. Acredita-se ainda que o conhecimento desses mecanismos possa conduzir estudos que viabilizem estratégias de controle do patógeno.

Guidot et al. (2009) avaliaram a extensão da transferência horizontal de genes entre diferentes isolados de *R. solanacearum* através de hibridização comparativa do genoma em microarranjos de DNA e seus resultados mostraram a transferência de blocos de DNA e 33 genes entre os isolados de *R. solanacearum* e múltiplas aquisições ao longo do genoma foram detectadas. Esses resultados condizem com os obtidos por Coupat et al. (2008) que concluíram que os mecanismos de transformação natural entre as espécies do complexo *R. solanacearum* pode ser considerada uma das principais forças para a evolução e adaptação dessa espécie.

Ralstonia solanacearum tem sido relatada em diversos estudos, com uso de técnicas moleculares (GONZÁLES et al., 2009; KHAKVAR et al., 2008; WICKER et al., 2007) como uma espécie complexa e altamente heterogênea. Apesar desse tipo de análise ser de grande utilidade como meio de conhecer e catalogar a diversidade das estirpes, ela fornece pouca base para a compreensão

da origem e do significado desta diversidade (COOK; SEQUEIRA, 1994), a qual se caracteriza como um grande obstáculo à produção de variedades resistentes, já que a resistência incorporada a um determinado isolado não irá conferir, necessariamente, resistência ou tolerância aos demais (GILLINGS; FAHY; DAVIES, 1993).

Técnicas moleculares têm sido utilizadas para dividir *R. solanacearum* em subgrupos. Cook, Barlow e Sequeira (1989), estudando isolados pertencentes as raças 1, 2 e 3, utilizando a técnica da restrição de fragmentos por polimorfismo de comprimento (RFLP) relataram a divisão da espécie em dois grupos, correspondentes às divisões 1 e 2, sendo a divisão 1 mais relacionada com isolados da Ásia e a divisão 2 com isolados obtidos nas Américas. Diversas outras investigações confirmaram a existência dessas duas divisões em isolados de *R. solanacearum* (GILLINGS; FAHY; DAVIES, 1993; SEAL; JACKSON; DANIELS, 1992; TAGHAVI et al., 1996). A análise da região ITS ('Internal transcribed spacer'), do gene da poligalacturonase e da endoglucanase (FEGAN et al., 1998 apud FEGAN; PRIOR, 2005), confirmam a existência dessas duas divisões e relata um terceiro grupo de isolados, originados da Indonésia. Poussier et al. (2000) analisando o gene *hrpB* relataram a existência de um quarto grupo, relacionado a isolados provenientes da África. A existência desses quatro grupos conduziu estudos para obtenção de uma nova classificação hierárquica que refletisse a heterogeneidade do patógeno. Dessa forma, Fegan e Prior (2005), com base na análise de dados gerados a partir do sequenciamento da região *ITS*, do gene da *endoglucanase* e do gene *mutS* de 86 isolados, representando as 5 raças, propuseram uma nova classificação, onde os isolados são subdivididos em quatro níveis taxonômicos: espécie, filotipos, sequevares e clones. Os mesmos autores definem *R. solanacearum* como um complexo de espécies, ou seja, "um grupo de isolados estreitamente relacionados os quais podem representar mais de uma espécie".

A divisão em filotipos se baseia na análise de variações de tamanho na sequência da região intergênica 16S-23S. A região ITS é amplamente utilizada para estudos de taxonomia e filogenia molecular, pelo fato de conter regiões flanqueadoras altamente conservadas e elevado grau de variação entre espécies, mesmo que estritamente relacionadas. O filotipo está fortemente relacionado com a origem geográfica do patógeno, o filotipo I inclui isolados da Ásia, o filotipo II isolados das Américas, no filotipo III ocorre isolados da África e algumas ilhas próximas e no filotipo IV isolados da Indonésia e também alguns isolados do Japão e Austrália.

Cada filotipo compreende certo número de sequevares (*Sequence variant*). Um sequevar é definido como um grupo de isolados com uma sequência altamente conservada dentro da região sequenciada. Os sequevares são primeiramente definidos de acordo com a sequência do gene da endoglucanase. A endoglucanase é uma enzima que tem importante papel na patogenicidade da bactéria, pois ela hidrolisa as ligações $\beta(1,4)$ dos filamentos de celulose produzindo oligossacarídeos que, por sua vez serão quebrados em mono, di, tri ou tetra sacarídeos por outras celulasas, a eficiência desse mecanismo garante o sucesso da penetração da bactéria na planta hospedeira (CHELLAPANDI; HIMANSHU, 2008).

Cook e Sequeira (1994), através do uso de RFLP, subdividiram todos os isolados de *R. solanacearum* raça 2 em 3 multilocus genotípicos, definidos como 24, 25 e 28. Posteriormente, com a nova classificação de filotipos e sequevares, Fegan e Prior (2005) determinaram que os multilocus 24, 25 e 28 correspondiam aos sequevares 3, 4 e 6, pertencentes ao filotipo II.

A determinação de filotipos e sequevares é facilmente identificada por meio de PCR multiplex, uma variação da PCR que permite a amplificação simultânea de diferentes sequências com a utilização de múltiplos iniciadores

por reação, o que torna a análise rápida e eficiente, entretanto, essa classificação é flexível, podendo agregar novos genótipos na medida em que são descobertos.

Técnicas moleculares para caracterização de *R. solanacearum* têm sido amplamente utilizadas para estudos em diversas regiões e têm-se mostrado bastante eficientes na classificação desse patógeno, além de ter proporcionado um grande volume de informações sobre os isolados pesquisados.

Estudos conduzidos por Ji et al. (2006) possibilitaram identificar, através de imunoenaios e PCR, que os diversos casos de murcha ocorrendo em gerânio, hortênsia e pimenta, em 2003 e 2004, foram causados por *R. solanacearum* biovars 1 e 3, e não pelo grupo R3B2 (raça 3, biovar 2), já que espécies como gerânio podem ser infectadas por ambas as raças. Além disso, esse estudo foi o primeiro relato de ocorrência de isolados pertencentes ao filotipo I na América do Norte e da ocorrência natural de *R. solanacearum* em hortênsia.

Em análises feitas nas Filipinas, Ivey et al. (2007) avaliaram a diversidade genética de um grupo de *R. solanacearum* a partir de linhagens coletadas em cinco províncias, utilizando o sistema de classificação hierárquica em espécie, filotipos e sequevars. Os dados confirmam a validade de classificação hierárquica em espécie e filotipo, mas não permitem relacionar os sequevars, já os perfis discriminantes de *fingerprinting* rep-PCR gerados são fáceis de empregar, em relação ao sequenciamento genético, e podem identificar polimorfismos dentro de uma amostra da população. Sugerindo ainda que mais estudos utilizando rep-PCR ou outros métodos de *fingerprinting* devam ser feitos para avaliar a relação dos genótipos com a localização, a virulência e o desenvolvimento da doença de cultivares resistentes além de possibilitar que outras estratégias de gestão possam ser melhor apoiadas.

A utilização do método de filotipos e de PCR baseado em ferramentas moleculares propostas (FEGAN; PRIOR, 2005) possibilitou também a identificação e caracterização de isolados de *R. solanacearum* da Martinica.

Possibilitando a identificação de linhagens pertencentes ao filotipo II/sequivar 4 que não foram patogênicas em banana, ocasionando sintomas de murcha principalmente em plantas de tomate, berinjela e pimentão, sendo então caracterizada como filotipo II/4 NPB (não patogênico em banana) constituindo uma nova variante do patógeno *R. solanacearum* (WICKER et al., 2007).

Uma análise da diversidade genética de 286 isolados foi feita a partir de 17 espécies de plantas em 13 províncias da China usando o esquema de classificação em filotipos e biovars (XU et al., 2009). Os resultados mostraram que os isolados chineses eram classificados em 75% pertencentes ao filotipo I (Ásia) e 25% ao filotipo II (América). Nesse mesmo estudo, através do sequenciamento do gene da endoglucanase, foram identificados três novos sequevars: 34, 44 e 48. O estudo também evidenciou um grupo de isolados geneticamente similar ao isolado de referência patogênico ao gengibre, se tratando do primeiro relato de ocorrência do mesmo na China.

No Brasil, Santana et al. (2009) caracterizaram 60 isolados de *R. solanacearum* biovar 2 quanto a espécie, filotipo e sequevar e confirmaram a prevalência de isolados pertencentes ao filotipo II, como esperado. Os perfis gerados por BOX-PCR puderam ainda agrupar os isolados de acordo com sua região geográfica e época de ocorrência. Em outro estudo conduzido por Lopes, Quezado-Soares e Melo (1994), foi possível constatar que a murcha bacteriana do tomateiro é mais facilmente controlada por meio de resistência genética nos locais em que a biovar 3 do patógeno for prevalente. Esses autores tem direcionado seus estudos na caracterização e diversidade de isolados de *R. solanacearum* raça 1, não sendo registrado, até o momento, um estudo de caracterização da diversidade de isolados de *R. solanacearum* raça 2 coletados em regiões brasileiras.

A importância do conhecimento do patógeno por meio da identificação e caracterização é imprescindível para que seja possível viabilizar a orientação das

estratégias de controle e, principalmente, os trabalhos de melhoramento genético para a obtenção de cultivares resistentes à murcha bacteriana.

REFERÊNCIAS

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. Burlington: Elsevier, 2005. 922 p.

ANUÁRIO DA AGRICULTURA BRASILEIRA. São Paulo: Instituto FNP, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 52, de 20 de novembro de 2007**. Aprova a norma técnica para a utilização da Permissão de Trânsito de Vegetais (PTV). Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislação.do/>>. Acesso em: 20 set. 2009.

CHELLAPANDI, P. E; HIMANSHU, M. Production of endoglucanase by the native strains of *Streptomyces* isolates in submerged fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, p. 122-127, 2008.

COENYE, T.; VANDAMME, P. Simple sequence repeats and compositional bias in the bipartite *Ralstonia solanacearum* GMI1000 genome. **BMC Genomics**, Ghent, v. 4, n. 10, p. 1471-2164, 2003.

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

COOK, D.; SEQUEIRA, L. Strain differentiation of *Pseudomonas solanacearum* by molecular genetic methods. In: HAYWARD, A. C.; HARTMAN, G. L. (Ed.). **Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum***. Wallingford: United Kingdom, 1994. p. 77-94.

COUPAT, B. et al. Natural transformation in the *Ralstonia solanacearum* species complex: number and size of DNA that can be transferred. **FEMS Microbiol Ecology**, Villeurbanne, v. 66, n. 14, p. 14-24, 2008.

FEGAN, M.; PRIOR, P. How complex is the *Ralstonia solanacearum* species complex. In: ALLEN, C.; PRIOR, P.; HAYWARD, A. C. (Ed.). **Bacterial wilt: the disease and the *Ralstonia solanacearum* Species complex**. St. Paul: American Phytopathological Society, 2005. p. 449-461.

GILLINGS, M.; FAHY, P.; DAVIES, C. Restriction analysis of na amplified polygalacturonase gene fragment differentiates strains of the phytopathogenic bacterium *Pseudomonas solanacearum*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 17, p. 44-48, 1993.

GONZÁLEZ, I.; ARIAS, Y.; PETEIRA, Y. Interacción planta-bacterias fitopatógenas: caso de estudio *Ralstonia Solanacearum*, plantas hospedantes. **Revista de Protección Vegetal**, La Habana, v. 24, p. 69-80, 2009.

GUIDOT, A. et al. Horizontal gene transfer between *Ralstonia solanacearum* strains detected by comparative genomic hybridization on microarrays. **ISME Journal**, Heteren, v. 3, p. 549-562, 2009.

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

IVEY, M. L. et al. Diversity of *Ralstonia solanacearum* infecting eggplant in the Philippines. **Phytopathology**, Ithaca, v. 97, n. 11, p.1467-1475, Nov. 2007.

Jl, P. et al. New diversity of *Ralstonia solanacearum* strains associated with vegetable and ornamental crops in Florida. **Plant Disease**, Davis, v. 91, n. 2, p. 195- 203, 2006.

KELMAN, A. **The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*: a literature review and bibliography**. Raleigh: North Carolina Agricultural Experiment Station, 1953. Technical Bulletin, 99.

KHAKVAR, R. et al. Genomic diversity of *Ralstonia solanacearum* Strains Isolated from banana farms in West Malaysia. **Plant Pathology Journal**, Bari, v. 7, n. 2, p. 162-167, 2008.

LAWRENCE, J. G. Gene transfer in bacteria: speciation without Species? **Theoretical Population Biology**, New York, v. 61, p. 449-460, 2002.

LOPES, C. A.; QUEZADO-SOARES, A. M.; MELO, P. E. Differential resistance of tomato cultigens to biovars 1 and 3 of *Pseudomonas solanacearum*. **Plant Disease**, Davis, v. 78, p. 1091-1094, 1994.

NOGUEIRA, E. M. C. Moko ou murcha bacteriana da bananeira. Cultura da banana. In: REUNIÃO ITINERANTE DE FITOSSANIDADE DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 13., 2005, Registro. **Anais...** Registro: IB, 2005. p. 23-27.

POUSSIER, S. et al. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* as assessed by PCR-RFLP of the *hrp* region, AFLP and 16S rRNA sequence analysis, and identification of an African subdivision. **Microbiology**, New York, v. 146, p. 1679-1692, 2000.

PRIOR, P.; FEGAN, M. Recent developments in the phylogeny and classification of *Ralstonia solanacearum*. **Acta Horticulturae**, Vignola, v. 695, p. 127-136, 2005.

SALANOUBAT, M. et al. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. **Nature**, London, v. 415, p. 497-502, 2002.

SANTANA, B. G. et al. **Diversidade de isolados brasileiros de *Ralstonia solanacearum* da biovar 2**. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia) - Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2009.

SEAL, S. E.; JACKSON, L. A.; DANIELS, M. J. Use of tRNA consensus primers to indicate subgroups of *Pseudomonas solanacearum* by polymerase chain reaction amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, p. 3759-3761, 1992.

SMITH, E. F. **A bacterial disease of tomato, eggplant and Irish potato (*Bacillus solanacearum* sp. Nov.)**. Washington: Department of Agriculture, 1896. v. 12, p. 1-28.

TAGHAVI, M. et al. Analysis of the phylogenetic relationships of strains of *Burkholderia solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, and the blood disease bacterium of banana based on 16S rRNA gene sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 46, p. 10-15, 1996.

THE ORAL ENGLISH PROFICIENCY PROGRAM / EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION. **Distribution maps of quarantine pests for Europe: *Ralstonia solanacearum* race 2**. [S. l.: s. n.], 2006. Disponível em: <<http://pqr.eppo.org/datas/PSDMS2/PSDMS2.pdf>>. Acesso em: 20 set. 2009.

WICKER, E. et al. *Ralstonia solanacearum* Strains from Martinique (French West Indies) Exhibiting a New Pathogenic Potential. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 6790-6801, 2007.

XU, J. et al. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains from China. **European Journal of Plant Pathology**, London, v. 125, p. 641-653, 2009.

YABUUCHI, E. et al. 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**, Tokyo, v. 39, p. 897-904, 1995.

ZAMBOLIM, L. (Org.). **Manejo integrado: Fruteiras tropicais - doenças e pragas**. Viçosa, MG: Suprema, 2002. 672 p.

CAPITULO 2

Análise da diversidade genética de *Ralstonia solanacearum* raça 2, agente causal do “moko-da-bananeira”, no Brasil.

RESUMO

Ralstonia solanacearum Smith é um fitopatógeno com extensa distribuição geográfica e ampla gama de hospedeiros. É o agente causal da murcha bacteriana em mais de 50 famílias botânicas, sendo considerada uma das mais importantes doenças de origem bacteriana no mundo devido à severidade dos danos causados, natureza sistêmica das infecções e características do patossistema que dificultam o seu controle. Em bananeira causa o moko-da-bananeira que pode atingir todos os órgãos vegetais, em diferentes estádios de desenvolvimento. Até o momento não existem medidas de controle fitossanitário eficientes ou variedades disponíveis que tenham qualquer nível de resistência ou tolerância à doença. Seu potencial de dano às plantações de bananeira é enorme, podendo chegar até a 100% de perdas. Um sistema de detecção precoce tem sido objeto de pesquisas por ter como finalidade impedir o avanço da doença, mantendo baixa a percentagem de sua incidência. A caracterização da estrutura e diversidade genética do patógeno é determinante para estudos de epidemiologia e orientação dos programas de manejo da doença. O objetivo deste trabalho foi caracterizar molecularmente isolados de *R. solanacearum* de acordo com a nova taxonomia de filotipos e sequevares e analisar os isolados a partir de três famílias de sequências repetitivas (rep-PCR) e oligonucleotídeos aleatórios (RAPD). Foram utilizados 33 isolados pertencentes à coleção da Embrapa Tabuleiros Costeiros (CPATC), oriundos de diversos hospedeiros, sendo a maioria associado à cultura da banana. A caracterização e determinação dos filotipos e sequevares foram feitas por meio de PCR Multiplex e verificou-se que a coleção do CPATC é composta por isolados pertencentes ao filotipo II (88%) e filotipo III (12%). A determinação dos sequevares através de multiplex PCR não foi satisfatória, devido à limitação da técnica de identificação de apenas três multilocus genotípicos. Foi possível relacionar os isolados a partir da análise de sequências repetitivas, sendo que com o iniciador ERIC visualizou-se claramente a separação dos isolados de *R. solanacearum* de acordo com a raça e o iniciador REP possibilitou discernir entre os filotipos, sendo essas duas análises as mais informativas. A técnica de oligonucleotídeos aleatórios (RAPD) se mostrou eficiente para agrupar os isolados de acordo com sua origem geográfica, entretanto necessita de um número elevado de marcas moleculares. Com esses resultados foi possível a caracterização do patógeno e o conhecimento da genética estrutural da população que além de ter aplicação direta com o manejo da doença, contribui para o entendimento da evolução desse organismo e de possíveis interações entre seus diferentes isolados e entre seus hospedeiros.

Palavras-chave: Banana. Murcha bacteriana. Variabilidade. Sequevar. Filotipo.

ABSTRACT

Ralstonia solanacearum Smith is a devastating plant pathogen with an global distribution and wide host range. It is the causal agent of bacterial wilts in more than 50 botanical families, and is considered one of the most important bacterial diseases in the world due to damage severity, systemic nature of infection and pathosystem characteristics that hinder their control. In banana causes moko-da-banana that can reach all plant organs in different developmental stages. For the moment, there are no efficient control measures or resistant varieties available that have any level of resistance or tolerance to disease, the potential damage to banana plantations is enormous, reaching up to 100%. An early detection system has been subject of research that aims to prevent disease progression, maintaining low the percentage of incidence. The characterization of the structure and genetic diversity of the pathogen is crucial to studies of epidemiology and orientation programs for disease management. The goal of this research was to molecularly characterize isolates of *R. solanacearum* according to new taxonomy of phylotypes and sequevars and analyze the isolates from three families of repetitive sequences (rep-PCR) and random primers (RAPD). We used 33 isolates from the collection of Embrapa Coastal Tablelands (CPATC) from various hosts, mostly associated with the banana crop. The characterization and determination of phylotypes and sequevars were made by Multiplex PCR and found that the collection is composed of CPATC isolates belonging to phylotypes II (88%) and phylotypes III (12%). The determination of sequevars by multiplex PCR was not satisfactory due to technical limitation of identifying only three multilocus genotypes. Significant relationships were isolated from the analysis of repetitive sequences, and with primer ERIC visualized clearly the separation of isolates of *R. solanacearum* according to race and the initiator REP possible to discern between phylotypes, which were the two most informative analyses. The technique of random primers (RAPD) was efficient to group the isolates according to their geographical origin, however requires a large number of molecular markers. With these results it was possible to characterize the pathogen and knowledge of the genetic structure of population as well as having direct application to the management of the disease contributes to understanding the evolution of this organism and its possible interactions between different isolates and their hosts.

Keywords: Banana. Bacterial wilt. Variability. Sequevar. Phylotype.

1 INTRODUÇÃO

Ralstonia solanacearum é um dos mais importantes patógenos bacterianos do mundo, capaz de causar danos em cerca de 450 espécies de plantas pertencentes a mais de 54 famílias botânicas, dentre elas, incluem-se culturas de alto valor econômico como tomate, banana, batata, berinjela, pimentão entre outras (XU et al., 2009). A importância da doença também se deve a ampla distribuição geográfica do patógeno que habita regiões tropicais e subtropicais e que vem estendendo sua disseminação, atingindo regiões temperadas da Europa e América do Norte (GENIN; BOUCHER, 2004).

Fenotipicamente, *R. solanacearum* tem sido classificada em cinco raças de acordo como a gama de hospedeiros (AGRIOS, 2005), sendo que a raça 1 ataca um grande número de espécies de plantas, incluindo batata, tomate, fumo e solanáceas em geral. A raça 2 ataca banana e helicônia. A raça 3 é considerada específica de batata, mas está associada a algumas outras solanáceas. A raça 4 ataca gengibre e a raça 5, amora (HAYWARD, 1994). Essa bactéria é também classificada em cinco biovars, baseados na utilização de três açúcares (lactose, maltose e celobiose) e três álcoois (manitol, sorbitol e dulcitol), como fonte única de carbono (HAYWARD, 1964). Porém, ambas as classificações apesar de serem amplamente utilizadas por sua simplicidade e praticidade, não refletem a heterogeneidade dos isolados de *R. solanacearum*, que apresentam variações quanto a gama de hospedeiros, distribuição geográfica, virulência, transmissão por insetos, propriedades fisiológicas e adaptação a diferentes temperaturas. Com o intuito de representar melhor essa variabilidade, Fegan e Prior (2005), analisando as sequências da região espaçadora intergênica 16S e 23S, e dos genes *egl*, *hrpB* e *mutS*, propuseram uma nova classificação hierárquica, subdividida em 4 níveis taxonômicos: Espécie, filotipo, sequevar e clone.

Os filotipos são analisados de acordo com as variações de tamanho da

sequência na região ITS. O filotipo está fortemente relacionado com a origem geográfica do patógeno, sendo o filotipo I e II compostos por Ásia e América, respectivamente, filotipo III isolados da África e o filotipo IV relacionado à Indonésia, Japão e Austrália. Essa divisão reflete melhor a heterogeneidade do complexo e pode agregar novos filotipos à medida que forem sendo descobertos.

Cada filotipo compreende um número de sequevares, o qual pode ser definido como um grupo de isolados com uma sequência altamente conservada dentro da região sequenciada, sendo primeiramente definidos de acordo com a sequência do gene da endoglucanase. Prior e Fegan (2005) estudando a análise da sequência do gene da endoglucanase de 56 isolados, sendo 31 pertencentes à raça 2, observaram o agrupamento desses isolados em três sequevares, 3, 4 e 6, sendo relacionados ao moko-da-bananeira. Para o moko-da-bananeira, a identificação dos sequevares 3, 4 e 6 pode ser feita por meio de PCR multiplex (PRIOR; FEGAN, 2005).

A caracterização da estrutura e diversidade genética do patógeno é determinante para estudos de epidemiologia e orientação de programas de controle da doença, principalmente em estratégias que visem resistência específica a estirpes pertencentes a determinados locais, já que apesar de altamente variável, vários estudos têm demonstrado que *R. solanacearum* tende a dividir em grupos fortemente relacionados com sua origem geográfica (COOK; SEQUEIRA, 1994).

A rápida identificação de *R. solanacearum* através de PCR foi proposta por Seal et al. (1992). Para tanto, DNA ribossomal e especialmente a região 16S rDNA foram os alvos mais utilizados para a busca de sequências de DNA específicas (ARAHAL et al., 2004).

Diversas técnicas moleculares, como RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), SSR (*Simple Sequence Repeats*) e RAPD (*Random Amplification of*

Polymorphic DNA), têm permitido o estudo do relacionamento filogenético e evolutivo de *R. solanacearum*, bem como rápida avaliação da variabilidade genética, a nível intraespecífico (COENYE; VANDAMME, 2003; POUSSIER et al., 1999; SILVEIRA et al., 2005; YU et al., 2003).

Outra técnica amplamente utilizada para caracterização e subdivisão de espécies bacterianas a nível intraespecífico são as famílias de sequências repetitivas de DNA presentes no genoma de bactérias (LOUWS et al., 1995). Três famílias foram estudadas mais detalhadamente, denominadas REP (*Repetitive Extragenic Palindromic*), ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) e BOX (MARTIN et al., 1992). As sequências REP foram descritas inicialmente como sequências com potencial regulatório dentro de regiões de operons não codificadoras em virtude da sua natureza palindrômica e devido a sua habilidade de formar estruturas estáveis de “stem-loop” no RNA transcrito (VERSALOVIC et al., 1991). Os elementos ERIC contêm uma sequência central repetitiva, invertida e altamente conservada, localizada na região intergênica (HULTON et al., 1991). Os elementos BOX parecem estar envolvidos na ligação da DNA girase e terminação da transcrição durante a replicação (VERSALOVIC et al., 1991). Dessa forma, a utilização da técnica de sequências repetitivas (REP, ERIC e BOX) tem se mostrado como uma ferramenta útil, pois essas sequências geram perfis de PCR distintos e reproduzíveis que podem ser utilizados para análises de grandes populações em diferentes níveis taxonômicos (LOUWS et al., 1999).

A complexidade genotípica e fenotípica de *R. solanacearum*, e sua ampla distribuição no mundo, levantaram diversos questionamentos relacionados à ocorrência desses organismos em diferentes áreas geográficas, inclusive em estados brasileiros (BUDDENHAGEN, 1985). Diversos autores (BRINGEL, 2002; COSTA et al., 2007; SANTANA et al., 2009; SILVEIRA et al., 2005) têm direcionado seus estudos na caracterização e diversidade de

isolados de *R. solanacearum* em estados brasileiros. Entretanto, todos esses estudos focam a raça 1 do patógeno, não sendo registrado, até o momento, um estudo de caracterização da diversidade de isolados de *R. solanacearum* raça 2 coletados em regiões brasileiras.

A proposta deste estudo foi classificar, quanto à filotipos e sequevares, um grupo de isolados brasileiros de *R. solanacearum* raça 2, de banana e helicônia; e avaliar a diversidade genética desses isolados por meio de marcadores moleculares (RAPD e rep-PCR). Nesse contexto também foi objetivo deste trabalho encontrar um marcador molecular que pudesse ser utilizado para o desenvolvimento futuro de um sistema de diagnose molecular específico para a raça 2.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Isolados de *Ralstonia solanacearum*

Trinta e três isolados de *Ralstonia solanacearum* pertencentes à coleção biológica da Embrapa Tabuleiros Costeiros foram utilizados, sendo 19 da raça 2 e 14 da raça 1 (Tabela 1).

Os isolados foram cultivados por 24 h em 4 mL de meio LB (Luria-Bertani) líquido (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Em seguida, 10 µL foram transferidos para 1 mL de meio LB novo e mantidos em agitador orbital a 200 rpm, com temperatura de 28°C, por 24 h. A suspensão bacteriana foi submetida à extração de DNA utilizando o kit de extração e purificação de DNA genômico Wizard® (Promega), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. O DNA obtido de cada isolado foi quantificado e a concentração foi ajustada para 25 ng/µL. O DNA genômico foi armazenado a -20°C até o uso.

Tabela 1 Isolados de *Ralstonia solanacearum* da coleção da Embrapa Tabuleiros Costeiros

	Identificação CPATC	Hospedeiro	Doador	Procedência	Filotipo	Biovar	Raça
1	TC01 – 01	<i>Musa sp</i>	IB-SBF	Humaitá – AM	II	I	2
2	TC01 – 02	<i>Musa sp</i>	IB-SBF	Pará	II	<i>n</i>	2
3	TC01 – 05	<i>Musa sp</i>	IB-SBF	Japoatã – SE	II	I	2
4	TC01 – 06	<i>Musa sp</i>	IB-SBF	Humaitá – AM	II	<i>n</i>	2
5	TC01 – 08	<i>Musa sp</i>	IB-SBF	Itacoara – AM	II	<i>n</i>	2
6	TC01 – 09	<i>Musa sp</i>	IB-SBF	Itacoara – AM	II	<i>n</i>	2
7	TC01 – 17	<i>Musa sp</i>	IB-SBF	Japoatã – SE	II	I	2
8	TC01 – 18	<i>Musa sp</i>	IB-SBF	Japoatã – SE	<i>n</i>	I	2
9	TC01 – 25	<i>Musa sp</i>	IB-SBF	Tabatinga – AM	II	I	2
10	TC01 – 26	<i>Musa sp</i>	IB-SBF	Japoatã – SE	II	I	2
11	TC01 – 29	<i>Musa sp</i>	CNPH	INPA – AM	II	I	2
12	TC01 – 42	<i>Musa sp</i>	MV	Canindé de São Francisco – SE	II	<i>n</i>	2
13	TC01 – 43	<i>Musa sp</i>	MV	Canindé de São Francisco – SE	II	<i>n</i>	2
14	TC01 – 44	<i>Musa sp</i>	MV	Cotinguiba Pindoba – SE	II	<i>n</i>	2
15	TC01 – 45	<i>Musa sp</i>	MV	Cotinguiba Pindoba – SE	II	<i>n</i>	2
16	TC02 – 01	<i>Heliconia sp</i>	IB-SBF	Abreu e Lima – PE	II	<i>n</i>	2
17	TC02 – 02	<i>Heliconia sp</i>	IB-SBF	Abreu e Lima – PE	II	<i>n</i>	2
18	TC02 – 03	<i>Heliconia sp</i>	IB-SBF	Abreu e Lima – PE	II	<i>n</i>	2
19	TC02 – 04	<i>Heliconia sp</i>	INPA	Coari – AM	<i>n</i>	I	2
20	TC03 – 02	<i>Solanum lycopersicum</i>	INPA	Umaitá – AM	II	I	1
21	TC03 – 03	<i>Solanum lycopersicum</i>	INPA	Manicore – AM	II	I	1
22	TC03 – 04	<i>Solanum lycopersicum</i>	CNPH	Guaraí – TO	III	III	1
23	TC03 – 05	<i>Solanum lycopersicum</i>	CNPH	Nova Friburgo – RJ	III	I	1
24	TC03 – 06	<i>Solanum lycopersicum</i>	CNPH	Domingo Martins – ES	II	I	1
25	TC04 – 01	<i>Solanum melongena</i>	INPA	B. Constant – AM	II	I	1
26	TC04 – 02	<i>Solanum melongena</i>	INPA	Parintins – AM	II	I	1
27	TC04 – 03	<i>Solanum melongena</i>	CNPH	Gurupi – TO	III	III	1
28	TC05 – 01	<i>Capsicum annum</i>	INPA	Boca do Acre – AM	II	III	1

Tabela 1, continua

	Identificação CPATC	Hospedeiro	Doador	Procedência	Filotipo	Biovar	Raça
29	TC05 – 02	<i>Capsicum annuum</i>	INPA	Parintins – AM	II	I	1
30	TC05 – 03	<i>Capsicum annuum</i>	CNPH	Camocin S. Felix – PE	III	III	1
31	TC06 – 01	<i>Capsicum chinense</i>	INPA	B. Constant – AM	II	III	1
32	TC06 – 02	<i>Capsicum chinense</i>	INPA	B. Constant – AM	II	III	1
33	TC07 – 01	<i>Solanum tuberosum</i>	CNPH	Pouso Alegre – MG	II	II	1

IB-SBF - Instituto Biológico - Seção de Bactérias Fitopatogênicas;

INPA - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia;

CNPH - Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças;

MV - Material Vegetal;

n – não identificado.

2.2 Certificação da espécie & Determinação dos filotipos e sequevares

A certificação quanto à espécie *R. solanacearum* foi realizada mediante amplificação de fragmentos específicos por PCR, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores específicos PS96H/I (SEAL et al., 1992) e Oli1/Y2 (SEAL et al., 1993), seguindo metodologia descrita pelos autores.

A técnica de PCR multiplex foi aplicada para determinar os filotipos e sequevares utilizando-se, respectivamente, os oligonucleotídeos iniciadores das séries Nmult e Mus (FEGAN; PRIOR, 2005). As condições de amplificação utilizadas foram similares às descritas por Fegan e Prior (2005).

Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose 2%, corados em Brometo de etídio (0,02 $\mu\text{L}/\text{mL}$) e visualizados através de luz ultravioleta.

2.3 Caracterização utilizando rep-PCR e RAPD

O rep-PCR foi realizado com os oligonucleotídeos iniciadores correspondentes às três sequências repetitivas REP, ERIC e BOX. A PCR foi conduzida de acordo com o protocolo descrito por Horita e Tsuchiya (2001).

O RAPD foi conduzido com 27 oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 2). As reações consistiram em um volume final de 25 μL , compostas por 0,5 μM de oligonucleotídeo iniciador, 1 U de Taq DNA polimerase (Promega), 0,2 mM de cada dNTP, tampão de reação (1x), 1,5 mM de MgCl_2 , 50 ng de DNA e água ultrapura para completar o volume da reação. Em todas as reações foram incluídos um controle negativo com água estéril. O programa de amplificação consistiu de uma desnaturação inicial a 96°C por 5 min, seguida por 35 ciclos de 94°C por 45 s, 36°C por 45 s, 72°C por 45 s e um período de extensão final a 72°C por 10 minutos.

Tabela 2 Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores RAPD

Oligonucleotídeo iniciador	Sequência (5' – 3')	Oligonucleotídeo iniciador	Sequência (5' – 3')
A 02	TGC CGA GCT G	B 18	CCA CAG CAG T
A 03	AGT CAG CCA C	C 02	GTG AGG CGT C
A 04	AAT CGG GCT G	F 01	ACG GAT CCT G
A 09	GGG TAA CGC C	I 02	GGA GGA GAG G
A 10	GTG ATC GCA G	K 20	GTG TCG CGA G
A 11	CAA TCG CCG T	S 01	CTA CTG GCG T
A 13	CAG CAC CCA C	S 18	CTG GCG AAC T
A 14	TCT GTG CTG G	W 02	ACC CCG CCA A
A 15	TTC CGA ACC C	W 04	CAG AAG CGG A
A 16	AGC CAG CGA A	W 13	CAC AGC GAC A
A 18	AGG TGA CCG T	W 19	CAA AGC GCT C
A 19	CAA ACG TCG G	X 01	CTG GGC ACG A
A 20	GTT GCG ATC C	X 03	TGG CGC AGT G
B 11	GTA GAC CCG T		

Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose (1,0% para o RAPD e 1,5% para rep-PCR), corados em Brometo de etídio (0,02 µL/mL) e visualizados através de luz ultravioleta.

2.4 Análise dos dados

A identificação específica de *R. solanacearum*, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores PS96H/I e Oli/Y2 foi feita pela visualização dos géis de agarose, observando a presença de fragmentos de DNA amplificados no tamanho esperado para cada oligonucleotídeo iniciador. Dessa mesma forma foi realizada a análise de identificação dos filotipos e sequevares.

Para os marcadores REP, ERIC, BOX e RAPD foram construídas matrizes binárias com os fragmentos gerados na amplificação. Os fragmentos obtidos foram utilizados para a construção de uma matriz binária, sendo (1) presença do fragmento e (0) ausência do fragmento. A partir dos dados binários,

foi calculada a matriz de similaridade para os genótipos, utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard (JACCARD, 1901). Com esse coeficiente e utilizando-se o método aglomerativo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with an Arithmetic Mean) (SNEATH; SOKAL, 1973) foram realizadas as análises de agrupamento e os valores de bootstrap (10.000 repetições) foram computados pelos softwares XLSTAT (2010) e Free Tree (PAVLICEK et al., 1999). Para o Free Tree as análises de agrupamento foram visualizadas através do software Tree View (PAGE, 1996).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Certificação da espécie & Determinação dos filotipos e sequevares

O DNA obtido por meio do kit de extração e purificação wizard[®] foi satisfatório no que se refere à pureza e qualidade das amostras. Os 33 isolados amplificaram com os oligonucleotídeos iniciadores Oli1/Y2 e PS96H/I, produzindo fragmentos de 287 pb e 172 pb, respectivamente. O oligonucleotídeo iniciador OLI1/Y2 tem sido utilizado, com sucesso, para especificar um isolado como pertencente a *R. solanacearum* e espécies relacionadas (*R. syzygii* e Blood Disease Bacterium) (ARAHAL et al., 2004; GROOVER et al., 2006; SEAL et al., 1993), entretanto a utilização desse oligonucleotídeo iniciador não permite discernir apenas *R. solanacearum*. O oligonucleotídeo iniciador PS96H/I é o único descrito até o momento como específico apenas para *R. solanacearum* (SEAL et al., 1992) porém, o desconhecimento de sua região alvo no genoma tem implicado em sua baixa utilização (ARAHAL et al., 2004). No presente estudo, foi realizada a análise conjunta dos oligonucleotídeos iniciadores com o intuito de garantir uma maior confiabilidade na certificação dos isolados de *R. solanacearum* da coleção CPATC.

Os 33 isolados identificados com ambos os oligonucleotídeos iniciadores específicos foram caracterizados quanto ao filotipo por meio da técnica de PCR multiplex. Os perfis eletroforéticos revelaram a amplificação de um fragmento de 372 pb em 27 dos isolados avaliados, caracterizando-os como pertencentes ao filotipo II, outros 4 isolados apresentaram um fragmento de 91 pb sendo relacionados ao filotipo III. Para dois isolados não foi possível a amplificação de nenhum fragmento correspondente aos filotipos conhecidos (Tabela 1, Figura 1).

Neste estudo foi possível observar que todos os isolados pertencentes à raça 2 se incluíram no filotipo II, como fundamentado inicialmente por Cook e Sequeira (1994) como sendo a divisão 2 e incluir todos os isolados provenientes de musáceas. O filotipo II está fortemente relacionado às Américas, entretanto, como observado por Cardozo et al. (2009), outros isolados provenientes de plantas de bananeira oriundas da África e Ásia estão associados ao filotipo II, indicando que ele pode estar mais relacionado ao moko-da-bananeira do que à distribuição geográfica global.

Os isolados TC01 – 18 e TC02 – 04 não amplificaram para nenhum filotipo. Para esses, outras estratégias poderão ser utilizadas, como por exemplo, o sequenciamento da região ITS que possibilitará verificar a qual filotipo o isolado pertence, ou se o isolado apresenta características genéticas distintas dos filotipos descritos até o momento.

O filotipo III é referido por conter isolados relacionados à África e ilhas próximas. Esses quatro isolados positivos para o filotipo III são pertencentes à raça 1, sendo TC03-05 e TC03-04 isolados de tomateiro do Rio de Janeiro e Tocantins, respectivamente, TC04-03 isolado a partir de plantas de beringela de Tocantins e TC05-03 obtido a partir de plantas de pimenta do Amazonas. A presença desse filotipo no Brasil é inesperada e pouco pode-se afirmar sobre esse isolado.

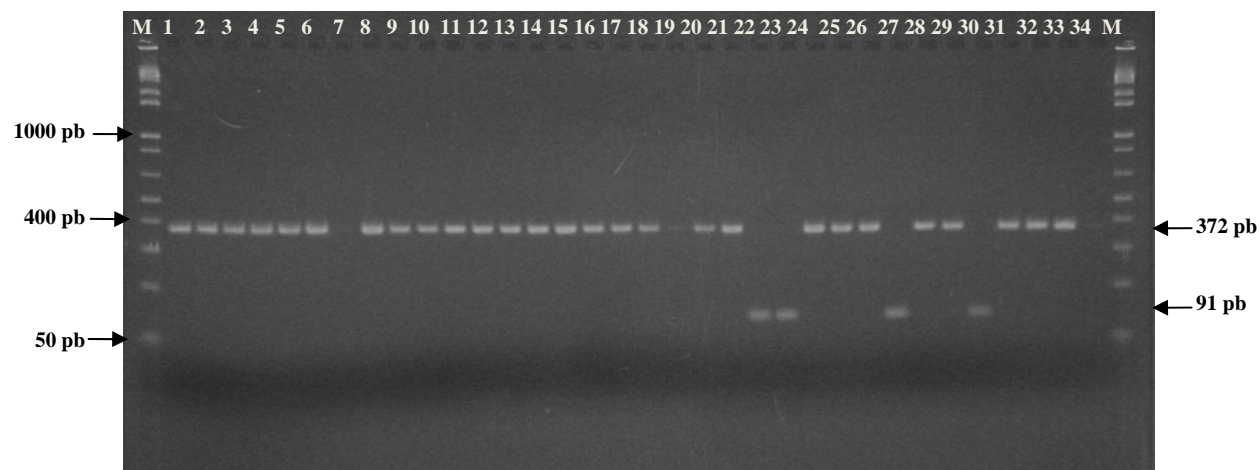


Figura 1 Gel 2% de agarose em TBE com as amostras resultantes da amplificação com a série Mus, para determinação dos filotipos. Ordem das amostras: **1.** TC01 – 06; **2.** TC01 – 01; **3.** TC01 – 08; **4.** TC01 – 25; **5.** TC01 – 09; **6.** TC01 – 29; **7.** TC01 – 18; **8.** TC01 – 05; **9.** TC01 – 26; **10.** TC01 – 17; **11.** TC01 – 41; **12.** TC01 – 42; **13.** TC01 – 43; **14.** TC01 – 44; **15.** TC01 – 02; **16.** TC02 – 01; **17.** TC02 – 02; **18.** TC02 – 03; **19.** TC02 – 04; **20.** TC03 – 02; **21.** TC03 – 03; **22.** TC03 – 04; **23.** TC03 – 05; **24.** TC03 – 06; **25.** TC04 – 01; **26.** TC04 – 02; **27.** TC04 – 03; **28.** TC05 – 01; **29.** TC05 – 02; **30.** TC05 – 03; **31.** TC06 – 01; **32.** TC06 – 02; **33.** TC07 – 01; e **34.** Controle Negativo. **M.** Marcador 1kb plus (Invitrogen). Setas à esquerda indicam o tamanho dos fragmentos do marcador e setas à direita indicam o tamanho dos fragmentos amplificados

A caracterização dos isolados de *R. solanacearum*, raça 2 relacionados ao filotipo II, tem grande importância para o manejo da doença do moko-da-bananeira nas plantações brasileiras pelas similaridades existentes entre esse grupo de isolados.

A série Nmult é capaz de distinguir três sequevares presentes em indivíduos pertencentes ao filotipo II, relacionado às Américas, definidos como sequevares 3, 4 e 6, compreendendo aos três multilocus genotípicos, descritos inicialmente para o moko-da-bananeira (PRIOR; FEGAN, 2005). A identificação dos sequevares tem sido obtida com sucesso em diversos estudos de caracterização (CARDOZO et al., 2009; FEGAN; PRIOR, 2005; XU et al., 2009) de isolados de *R. solanacearum* pertencentes à raça 2. No presente estudo, dentre os 27 isolados, pertencentes ao filotipo II, cinco tiveram seu sequevar determinado como sequevar 6, pela amplificação de um fragmento de 220 pb (Figura 2), sendo 3 isolados pertencentes à raça 2, patogênicos em helicônia (TC02 – 01, TC02 – 02 e TC02 - 03) e dois isolados patogênicos em berinjela, raça 1, (TC04 – 01 e TC04 – 02). Com os demais isolados (totalizando 22) não se obteve nenhuma amplificação, resultado que sugere a existência de outros sequevares relacionados ao moko da bananeira. Resultados semelhantes foram obtidos por Cardozo et al. 2009, em que a avaliação de 50 isolados permitiu a identificação de 35 isolados quanto ao sequevar. Resultados similares também foram obtidos por Fegan e Prior (2005), onde não foi possível a identificação dos sequevares de dois isolados brasileiros de banana, sugerindo, nesse caso, que os isolados brasileiros de banana provavelmente pertencem a um sequevar ainda não discriminado. Uma análise mais detalhada da sequência do gene da endoglucanase pode caracterizar esses isolados quanto ao sequevar, identificando novos sequevares relacionados ao moko-da-bananeira nesses isolados brasileiros.

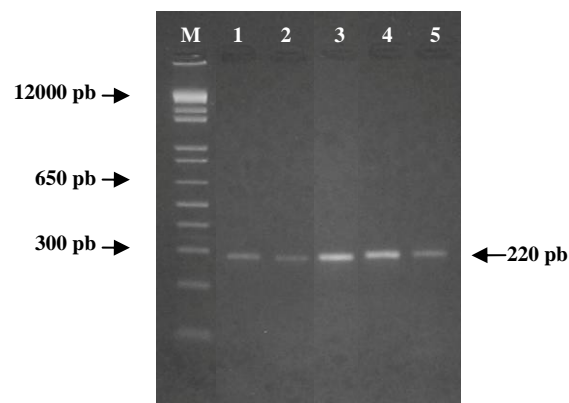


Figura 2 Gel 2% de agarose em TBE 1x com as amostras resultantes da amplificação com a série Nmult, para determinação dos sequevares (Gel parcial). Amostras: **M.** Marcador 1kb DNA plus (Invitrogen); **1.** TC02 – 02; **2.** TC02 – 03; **3.** TC02 – 01; **4.** TC04 – 01; **5.** TC04 – 02. Setas à esquerda indicam o tamanho dos fragmentos do marcador e setas à direita indicam o tamanho dos fragmentos amplificados

3.2 Caracterização utilizando rep-PCR

A diversidade genética dos 33 isolados foi analisada por rep-PCR. O perfil eletroforético gerado pela amplificação dessas sequências repetitivas resultou em 18 fragmentos com o iniciador ERIC (Figura 3a), 11 fragmentos com o iniciador REP (Figura 3b) e oito fragmentos com o iniciador BOX (Figura 3c).

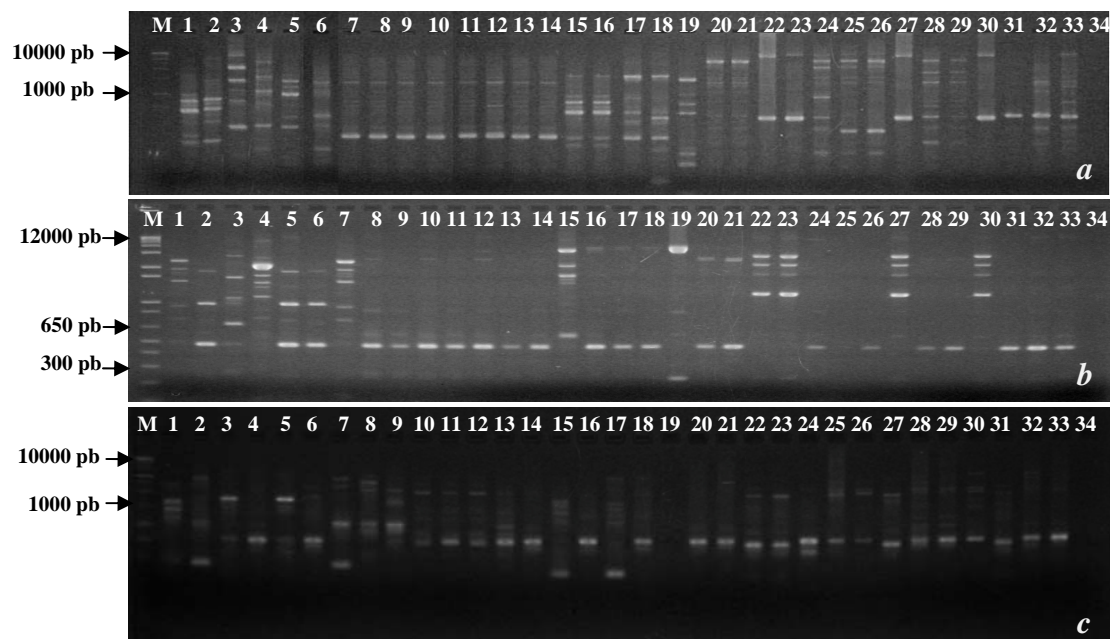


Figura 3 Perfis eletroforéticos obtidos pelos produtos da amplificação do DNA genômico de *Ralstonia solanacearum*. Ordem das amostras: **1.** TC01 - 06; **2.** TC01 - 01; **3.** TC01 - 08; **4.** TC01 - 25; **5.** TC01 - 09; **6.** TC01 - 29; **7.** TC01 - 18; **8.** TC01 - 05; **9.** TC01 - 26; **10.** TC01 - 17; **11.** TC01 - 41; **12.** TC01 - 42; **13.** TC01 - 43; **14.** TC01 - 44; **15.** TC01 - 02; **16.** TC02 - 01; **17.** TC02 - 02; **18.** TC02 - 03; **19.** TC02 - 04; **20.** TC03 - 02; **21.** TC03 - 03; **22.** TC03 - 04; **23.** TC03 - 05; **24.** TC03 - 06; **25.** TC04 - 01; **26.** TC04 - 02; **27.** TC04 - 03; **28.** TC05 - 01; **29.** TC05 - 02; **30.** TC05 - 03; **31.** TC06 - 01; **32.** TC06 - 02; **33.** TC07 - 01; e **34.** Controle Negativo. (a) Amplificação obtida com o iniciador ERIC (Gel Parcial); (b) Amplificação obtida com o iniciador REP; (c) Amplificação obtida com o iniciador BOX (Gel Parcial). Setas à esquerda indicam o tamanho dos fragmentos do marcador

A partir desses dados foram calculadas as matrizes de similaridade e utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard, os iniciadores foram analisados isoladamente (REP, ERIC e BOX) e em conjunto (rep-PCR).

A análise do dendrograma do iniciador ERIC (Figura 4) revelou a formação de três grupos (G1, G2 e G3) ao nível de 19% de similaridade, sendo que dois grupos (G2 e G3) apresentaram apenas isolados pertencentes à raça 2 e o outro grupo (G1) concentrou os isolados pertencentes à raça 1.

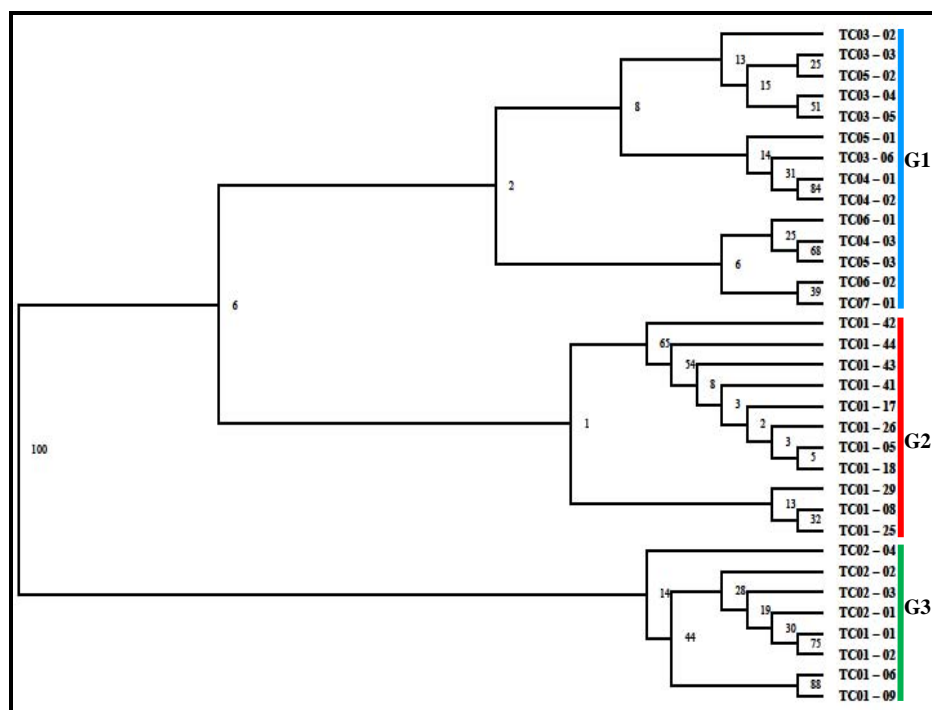


Figura 4 Dendrograma obtido a partir da análise de agrupamento dos isolados de *Ralstonia solanacearum* amplificados por ERIC-PCR

Resultados semelhantes foram obtidos por Bringel (2002), que analisando o oligonucleotídeo iniciador ERIC obteve a concentração dos isolados patogênicos em berinjela em um único grupo. Apesar de *R. solanacearum* ser uma espécie altamente heterogênea e complexa, a utilização da técnica de rep-PCR para estudos de diversidade e caracterização tem relatado uma forte relação com o hospedeiro (HORITA; TSUCHIYA, 2001; KUMAR et al., 2004; NORMAN et al., 2009). Esse perfil de agrupamento possivelmente está relacionado ao alto grau de conservação evolucionária desses elementos repetitivos.

O agrupamento dos isolados da raça 2, relacionada ao moko-da-bananeira, é um resultado que deve ser explorado, pois apesar de ser um patógeno heterogêneo, essa distinção através de sequências conservadas indica o alto grau de similaridade genotípica entre os isolados da raça 2 e pode ser altamente informativa para estratégias de manejo da doença.

Com o iniciador REP foi possível observar a formação de quatro grupos (G1, G2, G3 e G4) (Figura 5) ao nível de 21% de similaridade, sendo que três desses grupos foram mistos, compreendendo isolados pertencentes tanto à raça 1 quanto à raça 2, não revelando um perfil de agrupamento significativo para essa característica. Entretanto foi possível visualizar o agrupamento com 80% de similaridade dos quatro isolados (G4.1 - TC03 – 04, TC03 – 05, TC04 – 03 e TC05 – 03) pertencentes ao filotipo III, relacionado ao continente Africano. Bringel (2002) também encontrou correlação entre os grupos de isolados e o local de origem.

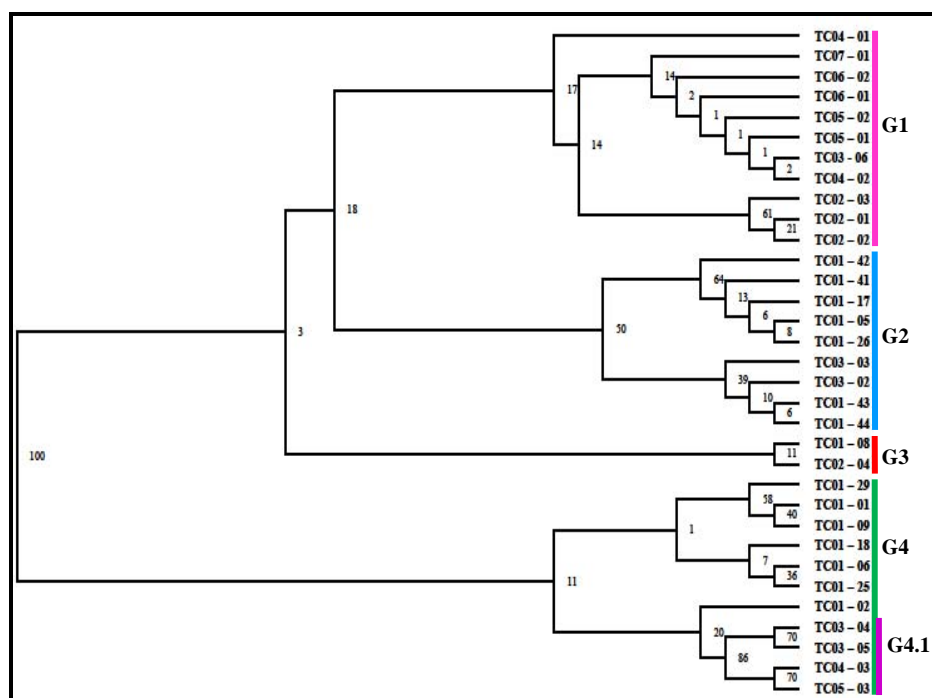


Figura 5 Dendrograma obtido a partir da análise de agrupamento dos isolados de *Ralstonia solanacearum* amplificados por REP-PCR

Apesar de ser um resultado interessante devido à possibilidade de direcionamento de estratégias de manejo e controle da doença, esses resultados não são comumente relatados na literatura, com a utilização de iniciadores repetitivos e altamente conservados, principalmente quando o agrupamento ocorre em microrregiões, onde a bactéria tem habilidade de se adaptar rapidamente, através de mecanismos como transferência horizontal de genes (GUIDOT et al., 2009), que irão conferir características adaptativas, e que provavelmente terão uma correlação maior com outros tipos de marcadores moleculares, como por exemplo o marcador RAPD.

Para o iniciador BOX, não houve nenhuma correlação dos grupos formados com as características dos isolados analisadas neste estudo, como, raça, biovar, filotipo, sequevar ou mesmo, região geográfica. O sucesso e a utilidade desses oligonucleotídeos iniciadores de sequência repetitiva para estudos de diversidade tem sido variável. Costa et al. (2007) usaram apenas o oligonucleotídeo iniciador BOX para analisar a diversidade genética de isolados de *R. solanacearum* patogênicos em tomate e outras hospedeiras e encontraram um alto grau de polimorfismo, entretanto não foi possível caracterizar os isolados de acordo com os biovars ou ecossistemas dos isolados. Resultados diferentes foram obtidos por Silveira et al. (2005) que diferenciaram as biovars 1 e 2 de isolados patogênicos em batata utilizando os iniciadores ERIC e BOX, porém nenhum dos iniciadores detectou variabilidade entre os isolados do biovar 2 e apenas o iniciador BOX detectou variabilidade entre os isolados do biovar 1. Cruz et al. (2002) utilizaram apenas o iniciador BOX para analisar diversidade genética entre isolados portugueses de *R. solanacearum* e observaram a alta capacidade discriminatória, devido ao alto número de bandas polimórficas.

A análise conjunta dos oligonucleotídeos iniciadores REP, ERIC e BOX permitiu a identificação de quatro grupos (Figura 6) à 15% de similaridade. A clara separação observada com o iniciador ERIC entre os isolados pertencentes à raça 1 e os isolados pertencentes à raça 2 não se manteve, ocorrendo a formação de dois grupos mistos, além de um grupo apenas com isolados da raça 1 e outro com isolados da raça 2. Entretanto houve uma melhor separação entre os isolados pertencentes ao filotipo III e os demais isolados.

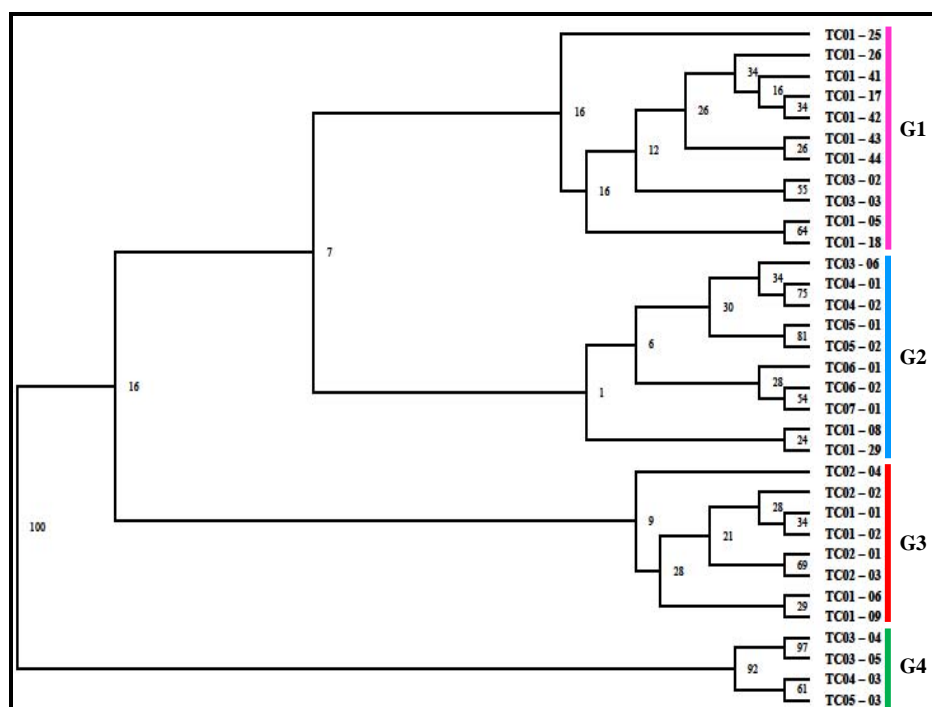


Figura 6 Dendrograma obtido a partir da análise de agrupamento dos isolados de *Ralstonia solanacearum* amplificados por rep-PCR

A utilização dos iniciadores REP, ERIC e BOX (rep-PCR), em conjunto, para caracterizar os isolados de *R. solanacearum* não mostrou nenhuma correlação com alguma nova característica, no entanto, observou-se que os isolados anteriormente agrupados com o iniciador ERIC de acordo com a raça formaram grupos mistos no rep-PCR (ERIC, REP e BOX). A fim de verificar a influência do iniciador BOX, o único em que não foi observada nenhuma relação entre os grupos, analisou-se o dendrograma obtido apenas com os fragmentos gerados pelos iniciadores REP e ERIC (Figura 7).

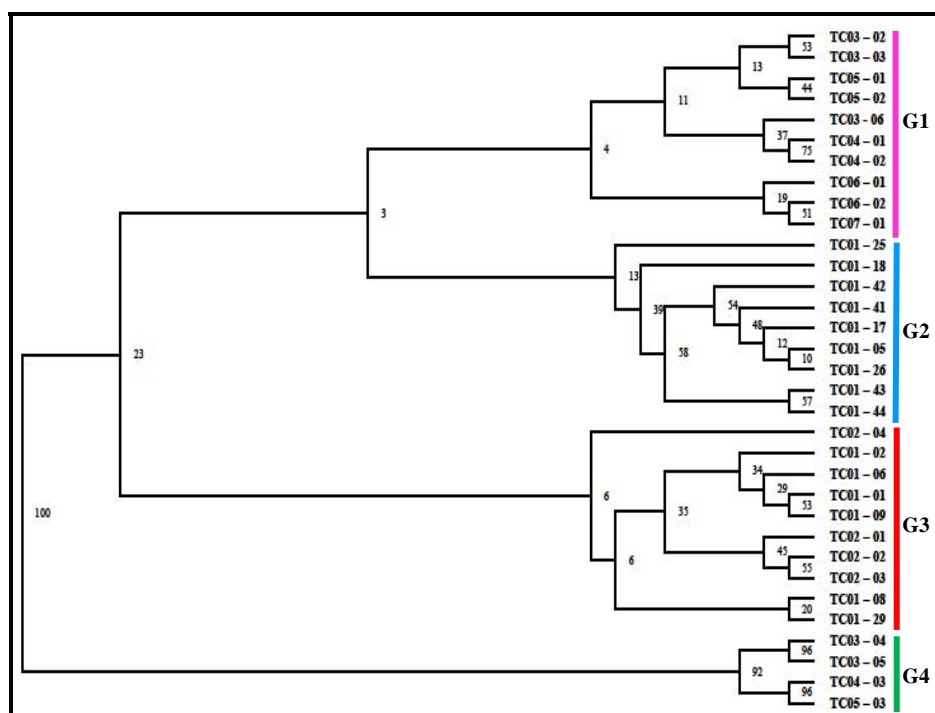


Figura 7 Dendrograma obtido a partir da análise de agrupamento dos isolados de *Ralstonia solanacearum* obtido por REP-ERIC

A análise do dendrograma revelou a formação de dois grupos maiores, onde os isolados pertencentes ao filotipo III formaram um grupo geneticamente distante dos demais isolados. É interessante observar que o iniciador ERIC contribuiu para melhor definição do agrupamento dos isolados pertencentes ao filotipo III, que formaram um grupo mais divergente dos demais.

3.3 Caracterização utilizando RAPD

Os 27 oligonucleotídeos iniciadores utilizados geraram um total de 231 fragmentos polimórficos (média de 8,5 fragmentos/oligonucleotídeos iniciadores), mostrando alta diversidade genética dos isolados bacterianos

avaliados. A análise do dendrograma (Figura 8) permitiu a visualização de 11 grupos, sendo que seis grupos só contêm isolados provenientes do Amazonas (G1, G2, G3, G7, G8 e G9), dois grupos com isolados de Sergipe (G4 e G5) e nos outros três grupos não houve separação por região geográfica. Essa relação entre marcadores RAPD e grupos relacionados com sua origem geográfica tem sido relatada em outros trabalhos (SILVEIRA et al., 2005; THWAITES et al., 1999), esse perfil de agrupamento observado quando se compara diversas regiões geográficas é claramente obtido com o uso de marcadores RAPD. Entretanto, a variabilidade entre os isolados do mesmo local é difícil de ser detectada, sendo necessários estudos com outros tipos de marcadores.

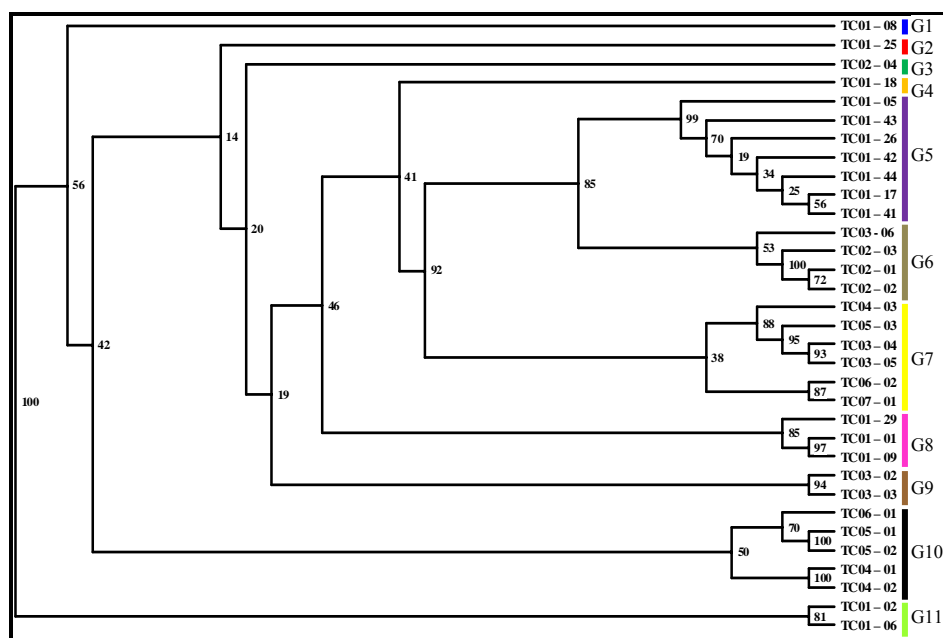


Figura 8 Dendrograma obtido a partir da análise de agrupamento dos isolados de *Ralstonia solanacearum* obtido por RAPD

A busca por um marcador molecular para a raça 2 que pudesse ser explorado como marcador para diagnose não foi possível com o número de marcas produzidas neste estudo. Entretanto essa informação deve ser ainda mais estudada devido a sua grande importância, principalmente por possibilitar a orientação de um sistema de diagnose de *R. solanacearum* raça 2, em plantas assintomáticas, e dessa forma a condução do manejo das plantas de modo que ocasione reduções na disseminação do patógeno.

4 CONCLUSÕES

Neste estudo foi possível observar que a Coleção Biológica CPATC de *R. solanacearum* é composta por isolados pertencentes ao filotipo II (82%) e filotipo III (12%), e, como esperado, ocorreu predominância do filotipo II, que abrangeu todos os isolados da raça 2, patogênico em musáceas, confirmando a forte relação do filotipo II com o moko-da-bananeira. A determinação dos sequevares com a utilização da técnica de PCR multiplex restringiu os resultados a três sequevares que não foram representativos para os isolados brasileiros, sugerindo que esses isolados pertencem a sequevares que só poderão ser identificados por meio da análise de sequenciamento do gene da endoglucanase.

A análise de sequências repetitivas de DNA amplificadas com os oligonucleotídeos iniciadores REP e ERIC permitiu a separação dos isolados de *R. solanacearum* de acordo com a raça e filotipo, já o oligonucleotídeo BOX não correlacionou com nenhuma característica estudada. Esses resultados são importantes para o conhecimento do patógeno e identificação de similaridades entre os grupos, principalmente entre as raças, para que possam ser alvo de pesquisas que identifiquem como o uso dessa similaridade pode ajudar em estratégias de manejo da doença.

A técnica de RAPD com base na amplificação aleatória do DNA genômico de *R. solanacearum* é eficiente para agrupar os isolados de acordo com sua origem geográfica, entretanto necessita de um número elevado de marcas moleculares, da mesma forma, não foi possível identificar nenhum marcador molecular para a raça 2 com o número de marcas obtidos.

Este estudo é a primeira etapa para o desenvolvimento de testes diagnósticos do moko-da-bananeira para rápida identificação e detecção desse patógeno em plantas assintomáticas, sendo importante para direcionar o manejo das plantas e evitar a disseminação do mesmo.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A construção da coleção biológica CPATC foi satisfatória para a realização deste estudo e a otimização dos protocolos de isolamento, preservação, extração e amplificação de DNA dos isolados de *Ralstonia solanacearum* será de grande utilidade para que essa coleção seja ativa e novos isolados sejam incorporados e estudados.

Neste estudo foi possível observar que a Coleção Biológica CPATC é composta por isolados pertencentes ao filotipo II (88%) e filotipo III (12%). Como esperado, ocorreu predominância do filotipo II e forte relação com os isolados relacionados ao moko-da-bananeira, evidenciando que esse filotipo tem alta associação com a doença. A identificação de isolados pertencentes ao filotipo III, relacionado ao continente africano, foi um resultado inesperado neste estudo, entretanto pouco pode se afirmar sobre a introdução e real distribuição desses isolados no Brasil.

A análise de sequências repetitivas de DNA amplificadas com os oligonucleotídeos iniciadores REP e ERIC permitiu a separação dos isolados de *R. solanacearum* de acordo com a raça e filotipo, já o oligonucleotídeo Box não

correlacionou com nenhuma característica estudada. Esses resultados são importantes para o conhecimento do patógeno, pois a nítida separação entre as raças 1 e 2 mostra a similaridade genotípica encontrada entre isolados pertencentes à mesma raça e pode ser utilizada para orientar novos estudos que visem à obtenção de estratégias de manejo e controle desses isolados.

Este estudo teve também por objetivo obter um sistema de diagnose molecular específico para *R. solanacearum* raça 2 por meio da busca por SNPs (Single Nucleotide Polymorphism), entretanto, essa etapa é mais extensa do que se esperava inicialmente, logo, mais tempo será necessário para que esses resultados possam ser obtidos.

Este é o primeiro estudo Brasileiro de caracterização de isolados de *Ralstonia solanacearum*, com foco nos patogênicos em banana e se constitui na primeira etapa para o desenvolvimento de testes diagnósticos da doença para rápida identificação e detecção desse patógeno em plantas assintomáticas, sendo importante para direcionar o manejo das plantas e evitar a disseminação do mesmo.

REFERÊNCIAS

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. Burlington: Elsevier, 2005. 922 p.

ARAHAL, D.R. et al. *In silico* evaluation of molecular probes for detection and identification of *Ralstonia solanacearum* and *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus*. **Systematic and applied microbiology**, Stuttgart, v. 27, p. 581-591, 2004.

BRINGEL, J. M. M. **Caracterização bioquímica, patogênica e molecular de isolados de *Ralstonia solanacearum* Biovar 2 de batata e berinjela**. 2002. 103 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2002.

COENYE, T.; VANDAMME, P. Simple sequences repeats and compositional bias in the bipartite *Ralstonia solanacearum* GMI1000 genome. **BMC Genomics**, Ghent, v. 4, n. 10, p. 1471-2164, 2003.

COOK, D.; SEQUEIRA, L. Strain differentiation of *Pseudomonas solanacearum* by molecular genetic methods. In: HAYWARD, A. C.; HARTMAN, G. L. (Ed.). **Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum***. Wallingford: United Kingdom, 1994. p. 77-94.

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

CRUZ, R. et al. Genetic diversity of portuguese isolates of *Ralstonia solanacearum* by minisatelite primed PCR and BOX-PCR. In: INTERNATIONAL BACTERIAL WILT SYMPOSIUM, 3., 2002, South Africa. **Anais...** South Africa: [s. n], 2002. p. 101.

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

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

GENIN, S.; BOUCHER C. Lessons learned from the genome analysis of *Ralstonia solanacearum*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 42, p. 107-134, 2004.

GUIDOT, A. et al. Horizontal gene transfer between *Ralstonia solanacearum* strains detected by comparative genomic hybridization on microarrays. **ISME Journal**, Heteren, v. 3, p. 549-562, 2009.

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

HORITA, M.; TSUCHIYA, K. Genetic diversity of japanese strains of *Ralstonia solanacearum*. **Phytopathology**, Ithaca, v. 91, p. 399-407, 2001.

HULTON, C. S. J.; HIGGINS, C. F.; SHARP, P. M. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 5, p. 825-834, 1991.

JACCARD, A. F. Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. **Bulletin de La Société Voudoise des Sciencis Natureller**, Payot, v. 37, p. 547-579, 1901.

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

KUMAR, A.; SARMA, Y. R.; ANANDARAJ, M. Evaluation of genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* causing bacterial wilt of ginger using REP-PCR and PCR-RFLP. **Current Science**, Bangalore, v. 87, p. 1555-1561, 2004.

LOUWS, F. J. et al. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. **Phytopathology**, Ithaca, v. 85, p. 528- 536, 1995.

LOUWS, F. J.; RADEMAKER, J. L. W.; BRUJIN, F. J. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phyto bacteria: diversity, detection, and disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, p. 81-125, 1999.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B. (Ed.) **Manual de práticas em fitobacteriologia**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2005. 171 p.

NORMAN, D. J. et al. Genetic diversity and host range variation of *Ralstonia solanacearum* strains entering North America. **Phytopathology**, Ithaca, v. 99, p. 1070-1077, 2009.

PAGE, R. D. M. Treevie view: an application to display phylogenetic trees on personal computers. **Computer Applications in the Biosciences**, Trier, v. 12, n. 4, p. 357-358, Aug. 1996.

PARAN, I.; MICHELMORE, R. W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 85, p. 985-993, 1993.

PAVLICEK, A.; HRDA, S.; FLEGR, J. Free tree: freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analyses of the tree robustness: applied to the RAPD analysis of the genus *Frenkelia*. **Folia Biologica**, Praha, p. 45, p. 97-99, 1999.

POUSSIER, S.; VANDEWALLE, P.; LUISETTI, J. Genetic diversity of African and Worldwide Strains of *Ralstonia solanacearum* as Determined by PCR - Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the *hrp* gene region. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 2184-2194, 1999.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. **Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria**. 3rd ed. St. Paul: APS, 2001. 370 p.

SEAL, S. E. et al. 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**, London, v. 139, p. 587-1594, 1993.

SEAL, S. E.; JACKSON, L. A.; DANIELS, M. J. Use of tRNA consensus primers to indicate subgroups of *Pseudomonas solanacearum* by polymerase chain reaction amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, p. 3759-3761, 1992.

SILVEIRA, J. R. P. et al. Caracterização de estirpes de *Ralstonia solanacearum* isoladas de plantas de batata com murcha bacteriana por PCR-rep e RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 615-622, 2005.

SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy**. San Francisco: W. H. Freeman, 1973. 573 p.

THWAITES, R. et al. RAPD and rep PCR-based fingerprinting of vascular bacterial pathogens of *Musa spp.* **Plant Pathology**, Bari, v. 48, p. 121-128, 1999.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, London, v. 19, p. 6823-6831, 1991.

XLSTAT: free trial version. Disponível em: <<http://www.xlstat.com/>>. Acesso em: 22 jul. 2010.

XU, J. et al. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains from China. **European Journal of Plant Pathology**, London, v. 125, p. 641-653, 2009.

YU, Q. et al. Molecular diversity of *Ralstonia solanacearum* isolated from ginger in Hawaii. **Phytopathology**, Ithaca, v. 93, p. 1124-1130, 2003.