



Universidade Católica de Brasília
Pró-Reitoria de Pós Graduação
Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia

Bárbara Garcia de Santana

Diversidade de isolados brasileiros de *Ralstonia solanacearum* da biovar 2

Brasília – DF
Outubro de 2009.

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Universidade Católica de Brasília
Pró-Reitoria de Pós Graduação
Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia

Diversidade de isolados brasileiros de *Ralstonia solanacearum* da biovar 2

Bárbara Garcia de Santana

Dissertação apresentada ao programa de Pós - Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Betania Ferraz Quirino

Co-orientador: Dr. Carlos Alberto Lopes

Brasília - DF
Outubro, 2009

S232d Santana, Bárbara Garcia de.
Diversidade de isolados brasileiros de *Ralstonia solanacearum* da biovar 2 / Bárbara Garcia de Santana, 2009.
114 f.: il.; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Católica de Brasília, Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Genômicas e Biotecnologia, 2009.
Orientação: Betania Ferraz Quirino.
Co-orientação: Carlos Alberto Lopes.

1. *Ralstonia solanacearum*. 2. Murcha bacteriana. 3. Fitopatologia. I. Quirino, Betania Ferraz, orient. II. Lopes. Carlos Alberto, orient. III. Título.


CDU 581.2

Dissertação de autoria de **Bárbara Garcia de Santana**, intitulada “**Diversidade de isolados brasileiros de *Ralstonia solanacearum* da biovar 2**”, apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília, em 26 de outubro de 2009 defendida e aprovada pela banca examinadora abaixo assinada:

Profa Dra. Betania Ferraz Quirino
Orientadora
Universidade Católica de Brasília – UCB

Prof. Dr. Carlos Alberto Lopes
Co – orientador
Embrapa Hortaliças – CNPH

Profa. Dra. Cristine Barreto Chaves
Examinador interno
Universidade Católica de Brasília – UCB



Prof. Dr. Marcelo Gravina de Moraes
Examinador externo
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Dedico esse trabalho especialmente aos meus pais que tanto me apoiaram e sempre confiaram em mim, mesmo quando eu mesma já não confiava mais.

AGRADECIMENTO

- Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, pois sem ele nada disso seria possível;
- Agradeço também aos meus orientadores Dra. Betania Quirino e Dr. Carlos Lopes que tiveram muita paciência comigo e sempre me ajudaram quando eu precisei;
- Agradeço especialmente a Idacuy, técnica do laboratório que sempre me socorreu seja na hora que eu procurava um reagente ou na hora que eu precisava desabafar sobre qualquer coisa;
- Agradeço muito a Dra. Cristine que chegou há pouco, mas me ajudou tanto a entender aquelas árvores filogenéticas que pareciam tão confusas;
- Quero agradecer de coração ao Ciro, a quem eu tanto incomodei com minhas dúvidas de como funcionava o Mega, o BioEdit e até mesmo o Word;
- Agradeço ao Prof. Kruger e a todo o seu grupo que sempre colaboraram, seja com empréstimos de material ou com fornecimento de conhecimento;
- Agradeço a todos os professores da pós-graduação que tanto contribuíram para tudo o que eu sei hoje sobre biomol, genética, bioquímica e tantas outras coisas;
- Agradeço a todos da Embrapa-Hortaliças que sempre me receberam muito bem e me ajudaram prontamente;
- Agradeço a todos que indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho;
- Por fim, agradeço a todos os meus amigos e colegas de laboratório, pois foram eles que fizeram essa experiência divertida.

"As coisas são semelhantes: isto faz a Ciência possível; as coisas são diferentes: isto faz a Ciência necessária." (Levins e Lewontin, 1985)

RESUMO

A bactéria de solo *Ralstonia solanacearum* (Rs), responsável pela murcha bacteriana em diversas espécies hospedeiras, é um complexo específico devido à sua diversidade genética. Historicamente, Rs tem sido classificada em biovares, baseado na utilização de açúcares e álcoois como fonte de carbono, e em raças, baseado na capacidade de infectar diferencialmente espécies hospedeiras. Esses sistemas de classificação, entretanto, não são adequados para explicar toda a variabilidade deste patógeno. Por isso, Fegan e Prior (2005) propuseram uma nova classificação em filotipos com base na região ITS (Intergenic Transcribed Sequence) entre os genes de RNA ribossomal 16S e 23S e sequevares baseados na sequência do gene da enzima endoglucanase. As recentes pesquisas indicam que o filotipo I foi originado na Ásia, o filotipo II nas Américas, o filotipo III originado na África e filotipo IV na Indonésia.

Neste trabalho, foram analisados 60 isolados brasileiros de *Ralstonia solanacearum* de procedência geográfica variada, a maioria deles associados à cultura da batata. Todos os isolados, pertencentes à coleção da Embrapa-Hortaliças, foram confirmados como pertencentes ao complexo específico *Ralstonia solanacearum* por meio de PCR com primers universais e posteriormente foram confirmados como sendo pertencentes à biovar 2.

A classificação em filotipos, realizada por meio de uma PCR multiplex, indicou que todos os isolados apresentaram fragmento amplificado correspondente ao filotipo II, com exceção de um isolado, obtido de pimentão em Brasília (filotipo IV). Esses resultados corroboram a expectativa da prevalência do filotipo II nas Américas. Sequenciamento e análise do gene endoglucanase (*egl*), mostrou que eles pertencem à sequevar 1 e 5 e que a variação entre linhagens de uma mesma região é baixa. Resultados de "fingerprint" de Box-PCR indicam que os isolados brasileiros são agrupados por região onde foram isolados e época de sua ocorrência.

ABSTRACT

The soil bacterium *Ralstonia solanacearum* (Rs), responsible for bacterial wilt in different hosts, is a species complex because of its genetic diversity. Historically, Rs has been classified into biovars based on the use of sugar and alcohol as carbon source, and races based on its ability to infect different hosts. These classification systems are not enough to portray all the variability of this pathogen. Therefore, Prior and Fegan (2005) proposed a new classification of phlotypes based on the ITS (Intergenic Transcribed Sequence) of the ribosomal RNA genes 16S and 23S and of sequevar based on the endoglucanase gene sequence.

We have studied 60 Brazilian strains of Rs from diverse geographical origins by traditional as well as molecular methods. All strains were confirmed as belonging to specific complex *Ralstonia solanacearum* by PCR with universal primers. All strains were also identified as biovar 2.

The characterization into phlotypes by a multiplex PCR indicated that all strains belong to the phlotype II group, except for one strain, obtained from pepper in Brasilia that showed an amplified fragment characteristic of phlotype IV. These results confirm the expectation of prevalence of phlotype II in the Americas. Sequencing and analysis of the endoglucanase gene (*egl*) showed that the strains studied belong to sequevars 1 and 5 and the variation among strains of the same region is low. Analysis of fingerprint results from Box-PCR indicates that the Brazilian isolates are grouped by the geographical region in which were isolated as well as the time of its occurrence.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Características da murcha bacteriana.....	20
Figura 2: Esquema mostrando a localização da região ITS entre as seqüências de RNA ribossomal.	23
Figura 3: Distribuição geográfica dos isolados brasileiros de <i>Ralstonia solanacearum</i>	36
Figura 4: Esquema do experimento para determinação de biovar utilizando placas <i>Deep Well</i>	39
Figura 5: Exemplo de isolados com diferentes características morfológicas..	44
Figura 6: Resultados dos testes para biovar 2A e 2T.....	47
Figura 7: Resultado da PCR multiplex para filotipo dos isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i>	48
Figura 8: Resultado da PCR multiplex para filotipo dos isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i>	49
Figura 9: Árvore filogenética (NJ) baseada na sequencia parcial do gene de endoglucanase (<i>egl</i>) de diversos isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i>	51
Figura 10: Padrão de bandas obtido através PCR feita com o primer Box..	53
Figura 11:Árvore construída pelo método de Neighbor Joining (NJ) com base no padrão de bandas de cada isolado após uma PCR com o primer Box.	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Hospedeiras e local de ocorrência de <i>Ralstonia solanacearum</i> de acordo com raças e biovars.	21
Tabela 2: Classificação de <i>Ralstonia solanacearum</i> de acordo com o consumo de açúcares e alcoóis.	22
Tabela 3: Esquema de classificação para <i>Ralstonia solanacearum</i>	24
Tabela 4: Origem geográfica de cada filotipo e tamanho dos fragmentos da região ITS gerados na PCR.	25
Tabela 5: Informações sobre os isolados utilizados neste trabalho.	37
Tabela 6: Sequências dos primers utilizados para as análises moleculares.	42
Tabela 7: Características morfológicas dos isolados crescidos em meio Kelman ágar por 96 horas.	45

LISTA DE ABREVIATURAS

% - Porcentagem

°C – Graus Celsius

µg – Micrograma

µL – Microlitro

BA - Bahia

cm – Centímetro

CNPH – Centro Nacional de Pesquisas em Hortaliças

DF – Distrito Federal

DNA – Ácido desoxirribonucléico

dNTP – Trifosfato de – oxinucleotídeos

egl - Endoglucanase

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EUA – Estados Unidos da América

g – Grama

g/L – Grama / Litro

GO – Goiás

h – Hora

ITS – Intergenic Transcribed Sequence

M – Molar

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MEGA – Molecular Evolutionary Genetic Analysis

MG – Minas Gerais

mg – Miligrama

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

mL – Mililitros

mL/L – Mililitros / Litros

mM – Milimolar

ng – Nanogramas

NJ – Neighbor Joining

NPB – Non Patogenic to Banana

pb – Pares de bases

pmol – Pico Mol

PCR – Polymerase Chain Reaction

pH – Potencial hidrogeniônico

PIB – Produto Interno Bruto

PR – Paraná

R3B2 – Raça 3 Biovar 2

RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism

RNA – Ácido Ribonucléico

rpm – Rotações por minuto

RS – Rio Grande do Sul

Rs – *Ralstonia solanacearum*

SP – São Paulo

TZC – Triphenyl Tetrazolium Chloride

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

UW – University of Wisconsin

SUMÁRIO

AGRADECIMENTO.....	5
RESUMO.....	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
INTRODUÇÃO	16
1. O patógeno	17
2. A doença.....	19
3. A classificação de <i>Ralstonia solanacearum</i>	20
JUSTIFICATIVA	29
HIPÓTESES.....	32
OBJETIVOS	34
METODOLOGIA.....	36
1. Isolados e suas origens	36
2. Caracterização morfológica	38
3. Classificação em biovar 2A e 2T	38
4. Extração de DNA genômico	39
5. Análises de PCR.....	40
Análise das seqüências	42
RESULTADOS	44
1. Análise morfológica	44
2. Classificação em biovar 2A e 2T	46
3. PCR multiplex para filotipo	48
4. Sequência do gene endoglucanase (<i>egl</i>).....	49
5. Box-PCR	52
DISCUSSÃO	56

PERSPECTIVAS FUTURAS.....	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
APÊNDICES.....	73
Apêndice 1 – Reagentes, soluções e meios de cultura.....	73
Apêndice 2 – Sequência do gene da endoglucanase e sua tradução.....	75
Apêndice 3 – Alinhamento.....	76
Apêndice 4 – Artigo	90

1. INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

O panorama da agricultura no Brasil vem apresentando profundas transformações nos últimos anos. A biotecnologia aparece hoje como referência e ponto de convergência no avanço tecnológico da agricultura. Neste contexto, a biotecnologia vem causando importantes transformações na pesquisa agrícola em todas as suas dimensões. Estamos vivendo uma mudança de paradigma (Salles-Filho & Bonacelli, 2003).

Realizando-se uma análise das tecnologias aplicadas à agroindústria, pode-se dizer que a biotecnologia aplicada à agricultura se mostra capaz de fazer importantes mudanças na produção agrícola mundial. Isto acontece porque nos primeiros anos deste século produziram-se grandes avanços na inovação biotecnológica. Considerando-se a segunda revolução tecnológica na história.

Através das ciências biológicas e agrícolas, tem-se conseguido superar as restrições impostas pela natureza à produção agrícola. Assim, conseguiu-se realizar grandes feitos, tais como alterar o ciclo natural de crescimento das plantas, modificar as respostas das plantas aos fatores bióticos, como resistência a pragas, e abióticos, como alterações climáticas (Tabieres *et al.*, 2003).

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o agronegócio brasileiro é uma atividade próspera e rentável, que atua com modernidade, eficiência e competitividade no mundo. O Brasil possui 388 milhões de hectares agriculturáveis e férteis e com alto índice de produtividade (MAPA, 2004).

O agronegócio representa hoje o maior impulsionador da economia do país, sendo responsável por 33% do Produto Interno Bruto (PIB), 42% das exportações totais e 37% dos empregos diretos e indiretos no Brasil. O excelente desenvolvimento das exportações e a transformação do país numa das mais respeitáveis plataformas mundiais do agronegócio não é devido exclusivamente à vocação do Brasil pela agropecuária, mas também ao grande desenvolvimento técnico – científico e à modernização das atividades rurais (MAPA, 2004).

O Brasil é um grande produtor de hortaliças solanáceas, bem como de outras importantes culturas que são hospedeiras de *R. solanacearum*. Até agora, nenhum estudo sobre a diversidade de isolados do patógeno utilizando os métodos moleculares mais recentes propostos por (Fegan & Prior, 2005; Prior & Fegan, 2005) foram publicados. Existem estudos sobre a diversidade de isolados brasileiros de *R. solanacearum* (Netto *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2007), mas eles não usam a abordagem molecular para atribuir aos diferentes isolados filotipo e sequevar. Antes deste estudo, havia apenas poucos relatos atribuindo os isolados brasileiros do filotipo II e, nesses estudos apenas duas linhagens de batata foram analisadas (Fegan & Prior, 2005; Wicker *et al.*, 2007; Guidot *et al.*, 2009).

Nesse sentido, faz-se de grande importância os estudos acerca dos fitopatógenos que acometem as plantações de batata, especialmente os causadores da murcha bacteriana. Este estudo focará no patógeno *Ralstonia solanacearum*.

1. O patógeno

Ralstonia solanacearum é um importante fitopatógeno causador de uma doença chamada murcha bacteriana. Esse patógeno possui características únicas e significantes, como a extensa faixa de hospedeiros com cerca de 200 espécies pertencentes a mais de 50 famílias botânicas. Entretanto, *R. solanacearum* afeta principalmente as espécies da família Solanaceae (Hayward, A. C., 1994). Essa gama incomum de hospedeiros oferece uma oportunidade única para análises de fatores de virulência, diversidade genética e bioquímica (Salanoubat *et al.*, 2002).

Ralstonia solanacearum é uma bactéria Gram-negativa, aeróbica, com formato de bastão, geralmente apresentando flagelos. Existem espécies dentro do gênero *Ralstonia* que são saprófitas, patogênicas ao homem e animais e espécies fitopatogênicas. O genoma de *R. solanacearum* é bipartido, composto de dois replicons circulares, um cromossomo de 3,7 megabases e um megaplasmídeo de 2,1 megabases (Genin & Boucher, 2004).

Ralstonia solanacearum é classificada filogeneticamente da seguinte maneira: domínio Bactéria, filo Proteobactéria, classe β -proteobactéria, ordem Burkholderiales, família Ralstoniaceae, gênero *Ralstonia*, espécie *Ralstonia solanacearum* (Smith) (Yabuuchi, 1995).

Ralstonia solanacearum é um fitopatógeno presente no solo bastante distribuído em regiões tropicais e de temperaturas mais altas (Swanson *et al.*, 2005). Este patógeno naturalmente infecta as raízes de seus hospedeiros entrando por feridas ou por onde as raízes secundárias emergem (Liu *et al.*, 2005). Ela invade os vasos xilêmicos e se espalha rapidamente para as partes aéreas da planta pelo sistema vascular. A disfunção vascular induzida pela colonização extensiva causa sintomas de murcha (Figura 1) e eventual morte da planta (Tans-Kersten *et al.*, 2004).

O controle da murcha bacteriana é bastante dificultado, pois *R. solanacearum* pode sobreviver saprofiticamente por longos períodos em diferentes tipos de solos (Denny, 2005). A capacidade de sobrevivência pode ser explicada pela capacidade do patógeno de utilizar uma variedade de compostos orgânicos como fonte de energia ou ainda pela habilidade de entrar em uma fase dormente (Grey & Steck, 2001). O patógeno usa compostos como açúcares e ácidos graxos e também pode utilizar compostos aromáticos derivados da degradação da lignina. Essa característica faz com que o solo continue sendo um ambiente favorável à manutenção desse patógeno mesmo após a morte do hospedeiro (Genin & Boucher, 2002). Esses fatores dificultam os testes de previsão de contaminação do terreno, pois as células continuam vivas e capazes de causar doença, porém não detectáveis.

À medida que se constata o aquecimento global, e como esse patógeno está bem adaptado ao solo e causa doenças em locais de altas temperaturas, é provável que *R. solanacearum* venha a se tornar um patógeno ainda mais destrutivo em áreas de cultivo de solanáceas (Jeong *et al.*, 2007), inclusive em batata no Brasil.

2. A doença

A murcha bacteriana é uma doença causada por *Ralstonia solanacearum* que pode levar a perdas de até 100% na produção de solanáceas (Lopes, 1994). Ocorre em todo Brasil, inclusive em áreas recém-desmatadas, tendo sido descrita em diversas solanáceas como batata (*Solanum tuberosum* L.), tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.), pimentão (*Capsicum annuum* L.), berinjela (*Solanum melongena* L.) e fumo (*Nicotiana tabacum* L.). A bactéria infecta também espécies cultivadas de outras famílias botânicas, como as musáceas banana (*Musa* spp.) e helicônia (*Heliconia* spp.); cucurbitáceas como pepino (*Cucumis sativus* L.) e abóbora-de-moita (*Cucurbita pepo* L.) (Hayward, A. C., 1994).

A murcha-bacteriana é uma das doenças mais importantes da batata no Brasil, sendo responsável por perdas elevadas na produção de batata-consumo e pela condenação de campos de certificação de batata-semente (Jabuonski & Hidalgo, 1987).

Ralstonia solanacearum infecta as raízes de seus hospedeiros e infectando o córtex radicular e invadindo os vasos xilemáticos (Liu *et al.*, 2005). Uma vez nos vasos xilemáticos, a bactéria se multiplica, espalhando-se rapidamente para as partes aéreas da planta pelo sistema vascular, atingindo densidade de células superior a 10^9 UFC/g de haste (Tans-Kersten *et al.*, 2004). As células bacterianas produzem polissacarídeos de alta viscosidade (pus bacteriano) que obstrui parcial ou totalmente o xilema, impedindo que a água atinja a parte aérea da planta (González & Allen, 2003).

O principal sintoma da infecção é a murcha da planta sem amarelecimento da parte aérea (Figura 1-A). Um dos métodos de diagnóstico das plantas infectadas é o teste-do-copo. Esse teste é feito mergulhando-se uma seção do caule em um copo transparente com água. Se houver exsudação de pus esbranquiçado (Figura 1-B), a probabilidade de a infecção ser por *R. solanacearum* é grande. Porém, esse método não consegue identificar qual o isolado que está infectando as plantas.



Fonte: Dr. Carlos Lopes

Figura 1: Características da murcha bacteriana. A - Plantas de *Solanum tuberosum* (Batata) com sintomas de murcha bacteriana. B – Exsudação de pus bacteriano no teste do copo.

3. A classificação de *Ralstonia solanacearum*

A taxonomia bacteriana em geral vem sofrendo mudanças contínuas e até radicais em consequência da incorporação sistemática de métodos de caracterização molecular dos ácidos nucléicos para a classificação (Takatsu & Lopes, 1997).

Ralstonia solanacearum é uma bactéria cosmopolita, extremamente variável, adaptada a um grande número de plantas hospedeiras, sob as mais diversas condições edafoclimáticas (Takatsu & Lopes, 1997). Dessa forma, ela foi classificada em nível infra-específico, em raças de acordo com sua capacidade de infectar diferentes hospedeiros (Buddenhagen *et al.*, 1962). Também os isolados foram separados em biovars, baseado na capacidade de utilizar açúcares e alcoóis (maltose, lactose, celobiose, manitol, dulcitol e sorbitol) como fontes de carbono (Hayward, 1991). O sistema de classificação em raça faz mais sentido agronomicamente, pois leva em consideração a reação da planta à doença (Tabela 1) enquanto a classificação em biovars baseia-se em testes bioquímicos e tem sido amplamente utilizada por ser facilmente reproduzível em diferentes laboratórios. Atualmente, são conhecidos cinco biovars para *R. solanacearum*.

A batata no Brasil é atacada pelas raças 1 e 3 de *R. solanacearum*. Nas regiões de clima mais ameno, a raça 3 é mais prevalente, porém a raça 1 (biovar 1) também pode estar presente (Lopes, 2005).

A raça 3 infecta mais especificamente a batata, por isto conhecida como “raça-da-batata”. Sobrevive por menos tempo no solo na ausência da cultura da batata por causa do número restrito de hospedeiros. Ocorre nas regiões mais frias de grande altitude ou latitude, que são as mais adequadas ao cultivo da batata, portanto, provocando doença em temperaturas mais baixas. É a raça prevalecente nas regiões Sul e Sudeste do Brasil (Lopes, 2005). Embora seja mais adaptada a temperaturas mais baixas, é um patógeno que tem temperatura ótima de crescimento em torno de 27-28°C. Portanto, a raça 3 pode ser encontrada em regiões de clima mais quente, como já constatado na região Nordeste do Brasil, devido a sua disseminação via batata-semente produzida no sul do país.

Tabela 1: Hospedeiras e local de ocorrência de *Ralstonia solanacearum* de acordo com raças e biovars. (Buddenhagen *et al.*, 1962).

Raça	Hospedeira	Ocorrência	Biovar
1	Muitas espécies, mais de 50 famílias	Ásia, Austrália, Américas	1, 3 e 4
2	Banana e outras espécies de musa	Brasil, Caribe, Filipinas	1
3	Batata (Ataca poucas outras espécies)	Geral, exceto EUA e Canadá	2
4	Gengibre	Ásia	3 e 4
5	Amora	China	5

Embora as classificações em raças e biovars tenham sido úteis nos últimos anos, têm a inconveniência de não serem consistentes, uma vez que se baseiam em características fenotípicas (Silveira *et al.*, 2005). Essa aparente homogeneidade das biovars pode diminuir quando se adicionam novos critérios, como aconteceu com a biovar 2. A adição de carboidratos, como trealose e inositol, revelou a existência de novos fenótipos para a biovar 2. A nomenclatura utilizada para separar esses subfenótipos foi biovar 2-A (A de Andino), que acomoda a raça 3 e os isolados especializados em batata

encontrados especialmente no Chile e na Colômbia. Já a biovar 2-T (T de Tropical) compreenderia os isolados de terras mais baixas encontrados especialmente no Peru e no Brasil (Tabela 2). Isolados classificados como pertencentes à biovar 2-A não consomem trealose e consomem inositol e os pertencentes a biovar 2-T consomem ambos os substratos (Hayward, A.C., 1994).

Tabela 2: Classificação de *Ralstonia solanacearum* de acordo com o consumo de açúcares e alcoóis (Hayward, A.C., 1994).

	Biovar 2A	Biovar 2A	Biovar 2T
Origem geográfica	Todos os continentes	Chile, Colômbia	Brasil, Peru
Substrato			
Inositol	-	+	+
Trealose	+	-	+

As primeiras técnicas moleculares usadas para se fazer o estudo do relacionamento filogenético e evolucionário de *R. solanacearum* foram as de "fingerprinting" genético como RFLP, RAPD, rep-PCR, eric-PCR. Essas técnicas consistem na utilização de primers que amplificam as regiões repetitivas do DNA criando um padrão único entre os indivíduos. Essa técnica foi desenvolvida, inicialmente, para uso forense, mas posteriormente a técnica pode ser usada para outros fins, como o de estudos de filogenia e de classificação de organismos (Griffiths *et al.*, 2008).

Com base em análises de RFLP "Restriction Fragment Length Polymorphism", foram definidos 33 grupos ou genótipos de *R. solanacearum*. Os coeficientes de similaridade gerados entre os grupos revelaram duas divisões distintas, que refletem um provável relacionamento filogenético, sendo a origem geográfica dos isolados a característica mais fortemente correlacionada (Silveira *et al.*, 2005). Posteriormente estudos usando técnicas como rep-PCR, eric-PCR e box-PCR passaram a ser utilizadas para separação dos grupos de *R. solanacearum* em linhagens clonais (Horita & Tsuchiya, 2001; Yu *et al.*, 2003; Ivey *et al.*, 2007). O estudo de Costa *et al.* (2007) usou as técnicas de rep-PCR e Eric-PCR para

analisar a diversidade de isolados da amazônia. Esse estudo encontrou um alto nível de polimorfismo entre os isolados da raça 1 da Região Amazônica e conseguiu obter uma separação de isolados de referencia da biovar 2 dos isolados amazônicos pertencentes as biovars 1 e 3 através dessas técnicas.

Estudos usando homologia de DNA-DNA revelaram que *R. solanacearum* não é uma espécie única e uma nova classificação a nível molecular se tornou necessária (Palleroni & Doudoroff, 1971). Por ter sido demonstrado que *R. solanacearum* se tratar de uma espécie bastante heterogênea, ela foi classificada como um complexo específico. Um complexo específico é definido por um grupo de isolados muito proximamente aparentados cujos membros individualmente podem ser de mais de uma espécie. O termo “complexo específico” foi primeiramente aplicado a *R. solanacearum* por Gillings & Fahy (1994) para refletir a variação genotípica e fenotípica da espécie.

Silveira *et al* (2005) caracterizaram isolados de *R. solanacearum* obtidos de plantas de batata no Rio Grande do Sul por meio de PCR-Rep e RAPD e concluíram que essas técnicas não são adequadas para detectar diferenças entre isolados da mesma biovar, recomendando outras técnicas para tal.

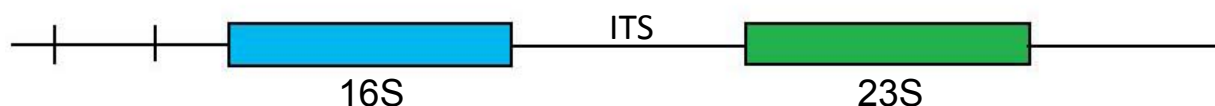


Figura 2: Esquema mostrando a localização da região ITS entre as sequências de RNA ribossomal.

Considerando todos esses estudos, foi proposta por (Fegan & Prior, 2005) uma nova classificação genética baseada em quatro níveis taxonômicos. Nessa nova proposta o termo “filotipo”, que é identificado por PCR multiplex baseado na região ITS (intergenic transcribed sequence) do cromossomo entre os genes de RNA ribossomal 16S e 23S (Figura 2), é usado para designar grupos maiores no nível de subespécies. O termo “sequevar”, que é identificado pela análise de sequência de genes de endoglucanases, é usado para designar

grupos infra-subespecíficos (Tabela 3). Essa nova classificação em “filotipos” e “sequevares” tem uma maior relevância filogenética, pois é baseada em dados de DNA, e esses são mais estáveis com o tempo.

A região ITS é um espaçador intergênico e está localizada entre regiões codificadoras de RNAs ribossômicos. Essas regiões espaçadoras ocorrem em *tandem*, com milhares de cópias no genoma, por isso é amplamente utilizada na taxonomia e filogenia molecular. Outras características importantes desse tipo de sequência é o fato de ser fácil de amplificar, pois existem regiões flanqueadoras bastante conservadas, e ter um elevado grau de variação mesmo entre espécies estreitamente relacionadas. Isto pode ser explicado pela baixa pressão seletiva que tais sequências sofrem, já que são sequências não-funcionais (Baldwin, 1992). A classificação em filotipos se baseia na variação de tamanho da sequência ITS (Tabela 4).

Tabela 3: Esquema de classificação para *Ralstonia solanacearum* (Fegan & Prior, 2005).

Nível Taxonômico	Equivalência taxonômica	Nomenclatura	Modo de identificação
Espécie	Espécie	Complexo <i>R. solanacearum</i>	PCR Primers
Filotipo	Subespécie	Filotipos I, II, III e IV	PCR multiplex baseada na região ITS
Sequevar	Grupos infra-subespecíficos	Sequevares 1 – 23	Sequenciamento do gene de endoglucanase
Clone	Linhagens clonais		Métodos de Fingerprinting (RAPD, AFLP, PFGE)

Estudos sobre essa abordagem de agrupamento dos isolados em filotipos mostram certa tendência de divisão em regiões geográficas. Filotipo I originado na Ásia, filotipo II nas Américas, o filotipo III na África e os pertencentes ao filotipo IV originados na Indonésia (Tabela 4), o que parece ser o centro da diversidade (Fegan & Prior, 2005; Prior & Fegan, 2005).

Cada filotipo é composto por um número de sequevares. Uma sequevar (*Sequence variant*) é definida como um grupo de isolados com a maior conservação de sequência

dentro da região gênica estudada (Fegan & Prior, 2005; Prior & Fegan, 2005). Para a classificação de *R. solanacearum* tem-se adotado o sequenciamento do gene da endoglucanase (Ji *et al.*, 2006; Ivey *et al.*, 2007; Wicker *et al.*, 2007).

Tabela 4: Origem geográfica de cada filotipo e tamanho dos fragmentos da região ITS gerados na PCR.

Filotipo	Origem	Tamanho do ITS (pb)
I	Ásia	144
II	América	372
III	África	91
IV	Indonésia	213

A endoglucanase é uma enzima pertencente à classe das celulases. Ela hidrolisa as ligações $\beta(1,4)$ dos filamentos de celulose produzindo oligossacarídeos. Esses oligossacarídeos, por sua vez, são quebrados em mono, di, tri ou tetra sacarídeos por outras celulases como a exoglucanase e a β -glicosidase. A endoglucanase é uma enzima que tem um papel importante na patogenicidade da bactéria, pois plantas são compostas basicamente de celulose e por isso um patógeno necessita de um aparato eficiente para hidrolisar esse carboidrato e assim conseguir penetrar no seu hospedeiro (Chellapandi & Himanshu, 2008).

A filogenia molecular surgiu com os avanços das técnicas de biologia molecular. Os dados das sequências de DNA e proteínas podem ser utilizados para a montagem de árvores filogenéticas de organismos proximamente (homens e macacos) ou distantemente relacionados (eucarióticos, eubactéria e arqueaeabactéria) (Nei & Kumar, 2000). Esse tipo de abordagem tem crescido muito, pois os dados moleculares de DNA e proteínas são mais consistentes, sofrem menos alterações do ambiente e com isso refletem melhor a história evolutiva dos organismos. Por isso, a escolha da ferramenta da filogenia molecular para melhor classificar os isolados de *R. solanacearum*.

A sequência do gene que codifica para a enzima endoglucanase foi sugerida por Fegan e Prior (2005) para o estudo das relações filogenéticas entre os isolados de *R.*

solanacearum. Este gene ocorre em cópia única no genoma e codifica um produto funcional, onde a pressão seletiva sobre ela é bem maior do que aquela sobre sequências não codificantes. Assim, sua sequência sofreu um número menor de mutações ao longo do processo evolutivo do organismo, podendo assim ser utilizada para a separação de grupos em níveis taxonômicos altos, como filo, classe e ordem (Nei & Kumar, 2000), mas nesse caso foi utilizado para classificar em nível infra-subespecíficos, pois apesar de *R. solanacearum* ser uma única espécie, a variedade tem se mostrado tão grande ao ponto do grupo ser chamado de complexo específico.

As novas técnicas moleculares de classificação de *R. solanacearum*, apesar de terem sido desenvolvidas recentemente, já têm sido amplamente usadas para estudos em alguns países e têm-se mostrado bastante eficientes na classificação desse patógeno. Um exemplo são os estudos na Flórida (Ji *et al.*, 2006) que mostraram 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), que é o grupo patogênico à batata. Estes isolados de *R. solanacearum* da Flórida englobam uma surpreendente diversidade, incluindo um cluster de isolados biovar 3 obtidos de pimenta que pertencem ao filotipo I sequevar 13; isolados filotipo II sequevar 5 que causaram doença em ambos gerânio e hortênsia, e outros isolados de hortênsia pertencentes ao filotipo II sequevar 7. O estudo não foi conclusivo quanto ao modo como estes foram importados para a Flórida, e de onde vieram.

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 proposto por Fegan e Prior (Fegan & Prior, 2005; Prior & Fegan, 2005). Os dados confirmam a validade de classificação hierárquica em espécie e filotipo, no entanto, não foi capaz de validar ou compreender plenamente a utilidade do sequevar no sistema de classificação de *R. solanacearum*. Os perfis discriminantes de *fingerprinting* rep-PCR abaixo do nível de sequevar são mais fáceis de empregar, em relação ao sequenciamento genético, e pode identificar polimorfismos dentro de uma amostra da

população. Sugere ainda que mais estudos utilizando rep-PCR ou outros métodos de *fingerprinting* sejam feitos para avaliar a relação dos genótipos com a localização, virulência, o desenvolvimento da doença de cultivares resistentes e outras estratégias de gestão podem ser melhor apoiados.

A utilização do método de filotipo e de PCR baseado em ferramentas moleculares propostas (Fegan & Prior, 2005; Prior & Fegan, 2005) possibilitou também a identificação e caracterização de isolados de *R. solanacearum* da Martinica. As linhagens da Martinica, pertencentes ao filotipo II/4NPB, devem ser consideradas uma nova variante patogênica dentro grupo filogenético II/4. Esta variante, que ataca principalmente plantas de banana, foi reconhecida na Martinica desde 1998 e isolados similares também foram obtidos no Brasil, Costa Rica e Trinidad e Tobago (Wicker *et al.*, 2007).

Ainda existem questões a serem abordadas sobre a epidemiologia e diversidade deste patógeno. Este estudo visa complementar os estudos existentes e analisar a diversidade de isolados brasileiros da biovar 2 utilizando os métodos moleculares propostos por Fegan & Prior (2005). Além disso, analisar a similaridade entre os isolados a partir de métodos de *fingerprinting* (Box PCR) e compará-los com a classificação previamente feita utilizando os métodos tradicionais de raça e biovar desenvolvidos por Hayward (1994) e Buddenhagen (1962), respectivamente.

2. JUSTIFICATIVA

JUSTIFICATIVA

A agricultura é uma das atividades de maior importância na economia brasileira. Um dos grandes problemas enfrentados pela agricultura é o ataque de fitopatógenos, que podem causar grandes perdas e diminuir a competitividade do Brasil no mercado mundial (Ho & Yang, 1999). Por isso, estudos que oferecem subsídios para um controle mais eficaz desses patógenos são tão importantes.

A murcha bacteriana, doença causada pela bactéria fitopatogênica de solo *Ralstonia solanacearum*, é a causa de perdas expressivas na agricultura comercial e de subsistência mundial, uma vez que entre seus hospedeiros estão o tomateiro, a batateira, o tabaco, o gerânio e a bananeira (Liu *et al.*, 2005).

Esse patógeno é muito variável e adaptado a diferentes condições de hospedeiro e de ambiente. Por isso, as classificações tradicionais, apesar de serem muito úteis, não têm sido mais tão eficientes na classificação dos diferentes isolados de *R. solanacearum*. Surgiu então uma necessidade de usar ferramentas moleculares para que se pudesse melhorar e tornar mais eficiente o sistema de classificação atual.

Dados moleculares são poderosas ferramentas de estudo da história evolutiva, possibilitando a reconstrução da filogenia de organismos vivos, complementando os métodos tradicionais de classificação dos organismos, como a morfologia e fisiologia. Sendo assim, com a combinação dos métodos moleculares e métodos tradicionais será possível reconstruir modelos mais precisos que reflitam de forma correta as relações entre os organismos.

O Brasil é um país tropical e com uma variedade muito grande de cultivos, por isso, a bactéria *R. solanacearum* conseguiu se adaptar tão bem aos solos brasileiros. Existem diferentes raças e biovars presentes nos solos do país e até agora poucos estudos de classificações foram feitos (Netto *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2007) sendo que nenhum desses com as novas metodologias moleculares de filotipo e sequevar.

Nesse trabalho foi analisada uma coleção de 60 isolados de diferentes regiões brasileiras (Figura 3), todos pertencentes à biovar 2. Foi feita uma classificação morfológica, que é mais básica. Uma classificação em filotipo e em sequevar que é o método mais recente proposto e a análise de similaridade por *fingerprinting* para cada isolado.

A caracterização de isolados brasileiros do patógeno por meio de técnicas moleculares modernas, em filotipos e sequevares, conforme proposta recente e bem aceita pela comunidade internacional (Fegan & Prior, 2005), permitirá entender melhor a variabilidade do patógeno e suas consequências no desenvolvimento de técnicas de controle da murcha bacteriana.

3. HIPÓTESES

HIPÓTESES

- ✓ Existe variabilidade entre isolados da raça 3 biovar 2 de *R. solanacearum* que atacam batata no Brasil;
- ✓ Todos os isolados pertencem ao filotipo II, já que, segundo a literatura, o filotipo II é prevalente nas Américas;
- ✓ Os métodos de classificação molecular (filotipos e sequevares) e os tradicionais (raça e biovar) de raças e biovares são complementares na separação Dops isolados de *R. solanacearum*.

4. OBJETIVOS

OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi caracterizar uma coleção de 60 isolados brasileiros do complexo específico *Ralstonia solanacearum*, pertencentes a raça 3 biovar 2 obtidos de batata, através de métodos tradicionais e moleculares.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- ✓ Analisar a morfologia das colônias dos diferentes isolados;
- ✓ Realizar bioensaios com diferentes álcoois e açúcares para confirmação em biovar 2 e separação em biovar 2A e 2T;
- ✓ Realizar PCR multiplex para classificar os isolados em filotipo;
- ✓ Amplificar e sequenciar um fragmento do gene de endoglucanase (*egl*) para classificação em sequevares;
- ✓ Utilizar a Box-PCR como um método de *fingerprinting* para separação de linhagens clonais.

5. METODOLOGIA

METODOLOGIA

1. Isolados e suas origens

Os isolados utilizados nesse trabalho estão listados na tabela 5. Foram obtidos de uma coleção da Embrapa – Hortaliças, Brasília, Brasil. A coleção é composta por 49 isolados obtidos de plantas de batata (*Solanum tuberosum*), dois isolados de pimentão (*Capsicum annuum*), oito de berinjela (*Solanum melogena*) e um de tomate (*Solanum lycopersicum*). Os isolados foram coletados em diferentes regiões do Brasil (Figura 3) e em diferentes períodos, tanto de seca quanto de chuva (Tabela 5).



Figura 3: Distribuição geográfica dos isolados brasileiros, utilizados nesse trabalho, de *Ralstonia solanacearum*. À esquerda, o mapa do Brasil inteiro é mostrado. À direita, os estados do Brasil onde os isolados utilizados neste estudo foram coletados são apresentados em maior detalhe. O número de amostras coletadas em cada estado é exibido entre parênteses.

Para purificação e estocagem dos isolados, o meio de cultura Kelman modificado foi utilizado (Kelman, 1954). Os isolados foram recuperados sendo riscados em uma placa de Petri com meio Kelman modificado e foram incubados a 28°C por 48h. Com uma alça de platina, uma quantidade de massa de cultura bacteriana obtida de placa de Petri foram colocados em um criotubo com 2mL de água bidestilada e estéril e as culturas foram mantidas à temperatura ambiente. Para armazenamento por longo prazo, outros 10µL de cultura foram adicionados a um criotubo contendo meio Kelman e glicerol (Sambrock *et al.*, 1989) e estocados a -80° C.

Tabela 5: Informações sobre os isolados utilizados neste trabalho.

Isolado	Procedência	Ano	Hospedeiro
GMI 1000	Guiana Francesa	-	Tomate
UW 151	-	-	-
UW 443	West Java, Indonesia	1987	Banana
UW 373	-	-	-
UW 363	China	-	Tomate
UW 386	Nigeria	1983	Tomate
K 60	Raleigh, NC	1954	Tomate
RS 02	Brasília (DF)	1987	Batata
RS 12	Itapetininga (SP)	1987	Batata
RS 23	Mucugê (BA)	1988	Batata
RS 26	Castro (PR)	1988	Batata
RS 27	Castro (PR)	1988	Batata
RS 28	Castro (PR)	1988	Batata
RS 30	Umuarama (PR)	1988	Batata
RS 44	Brasília (DF)	1989	Batata
RS 59	Castro (PR)	1990	Batata
RS 66	Ibicoara (BA)	1990	Batata
RS 67	Ibicoara (BA)	1990	Batata
RS 68	Ibicoara (BA)	1990	Batata
RS 69	Ibicoara (BA)	1990	Batata
RS 71	Brazlândia (DF)	1990	Berinjela
RS 77	Brasília (DF)	1991	Berinjela
RS 81	Brasília (DF)	1992	Berinjela
RS 82	Brasília (DF)	1992	Berinjela
RS 83	Brasília (DF)	1992	Berinjela
RS 84	Brasília (DF)	1992	Berinjela
RS 87	Brasília (DF)	1992	Berinjela
RS 89	Brasília (DF)	1992	Berinjela
RS 90	Brasília (DF)	1992	Batata
RS 91	Brasília (DF)	1992	Batata
RS 92	Brasília (DF)	1992	Batata
RS 94	Pirai do Sul (PR)	1992	Batata
RS 95	Pirai do Sul (PR)	1992	Batata

RS 96	Pirai do Sul (PR)	1992	Batata
RS 98	Pirai do Sul (PR)	1992	Batata
RS 99	Pirai do Sul (PR)	1992	Batata
RS 113	Mariental (PR)	1992	Batata
RS 115	Lapa (PR)	1992	Batata
RS 121	Vargem Bonita (MG)	1995	Tomate
RS 131	Araucária (PR)	1995	Batata
RS 134	Contenda (PR)	1995	Batata
RS 139	Lapa (PR)	1995	Batata
RS 141	Lapa (PR)	1997	Batata
RS 145	Viçosa (MG)	1997	Batata
RS 156	Cristalina (GO)	1997	Batata
RS 157	Cristalina (GO)	1997	Batata
RS 161	Morro Redondo (RS)	1997	Batata
RS 199	Brasília (DF)	2001	Pimentão
RS 201	Brasília (DF)	2001	Pimentão
RS 202	Castro (PR)	2001	Batata
RS 203	Castro (PR)	2001	Batata
RS 204	Castro (PR)	2001	Batata
RS 205	Cristalina (GO)	2002	Batata
RS 213	Ibicoara (BA)	2003	Batata
RS 231	Buritis (MG)	2004	Batata
RS 240	Cristalina (GO)	2004	Batata
RS 241	Tatui (SP)	2004	Batata
RS 242	Tatui (SP)	2004	Batata
RS 243	Saturno (SP)	2004	Batata
RS 244	Saturno (SP)	2004	Batata
RS 245	Cidade Ocidental (GO)	2005	Batata
RS 246	Uberaba (MG)	2005	Batata
RS 252	Contenda (PR)	2005	Batata
RS 253	Contenda (PR)	2005	Batata
RS 254	Contenda (PR)	2005	Batata
RS 260	Mucugê (BA)	2005	Batata
RS 261	Mucugê (BA)	2005	Batata

2. Caracterização morfológica

Para a caracterização morfológica, os isolados foram crescidos em placas de meio Kelman ágar a 28°C por 4 dias. As colônias foram então analisadas quanto ao tamanho, produção de muco e produção de melanina.

3. Classificação em biovar 2A e 2T

Os isolados foram classificados em biovar usando uma variação dos testes fisiológicos desenvolvidos por (Hayward, 1964). Para a realização dos testes, o meio de cultura básico proposto por Hayward contendo 1% dos substratos era esterilizado por meio

de autoclavagem por 10min. Depois 2 mL de meio Hayward já esterilizado contendo foram dispensados em poços de placas *deep well* com 24 poços cada uma (Figura 4); meio básico sem fonte de carbono serviu como controle negativo. Uma massa de cultura celular de cada isolado a ser testado foi raspado do meio Kelman modificado ágar e suspenso em 1 mL de água bidestilada estéril. Todos os testes incluíram isolados controles da biovar 1 (K60), biovar 2 (UW551), biovar 3 (GMI1000), Biovar 4 (UW151), e Biovar 5 (UW373) (Ji *et al.*, 2006) (Gentilmente cedidos pela Dra. Caitilyn Allen, University of Wisconsin-Madison). Cada poço foi semeado com 3 µl da suspensão e cada teste foi repetido três vezes, incluindo os controles não inoculados. As placas foram incubadas a 28°C durante 3 semanas e a mudança de cor de cada poço foi registrada diariamente.

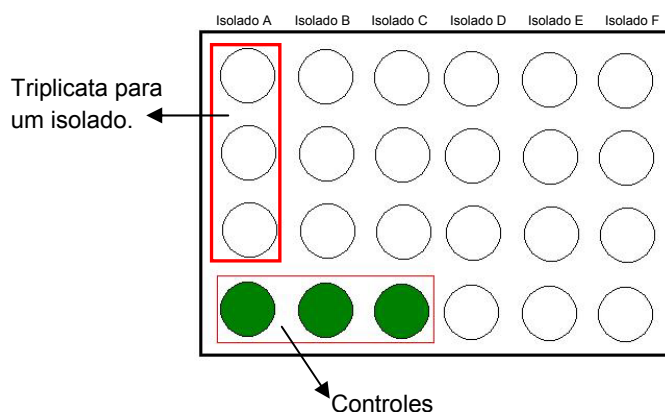


Figura 4: Esquema do experimento para determinação da biovar de *Ralstonia solanacearum* utilizando placas *Deep Well*. Cada placa foi utilizada para um substrato e cada isolado foi colocado em triplicata.

4. Extração de DNA genômico

Para extração do DNA genômico, os isolados de *R. solanacearum* foram crescidos em 3 mL de meio Kelman modificado a 28°C com agitação de aproximadamente 200 rpm por 48 horas. As células foram coletadas por centrifugação e o DNA extraído usando o kit Masterpure DNA purification kit (Epicentre Biotechnology). O protocolo utilizado foi o do fabricante do kit (Apendice 1).

5. Análises de PCR

Para diagnóstico por PCR, os isolados foram incubados por 12 horas em meio Kelman modificado a 28°C e 200 rpm. Aproximadamente 1 mL da cultura foi transferido para outro tubo e o molde de DNA para a PCR foi isolado das células de *R. solanacearum* utilizando o kit Masterpure DNA purification kit (Epicentre Biotechnology). O protocolo utilizado foi o sugerido pelo fabricante do kit (Apendice 2).

Quatro procedimentos de PCR, descritos por Fegan & Prior (2005), foram realizados para caracterizar os isolados. A primeira PCR foi realizada para confirmar se todos os isolados pertenciam realmente ao complexo específico *R. solanacearum*. Foram utilizados os iniciadores 759/760 como um marcador interno fornecendo um produto de aproximadamente 280-bp, que é específico para a *R. solanacearum* (Opina *et al.*, 1997).

A outra PCR realizada foi para identificar a qual filotipo os isolados pertencem. A reação de PCR incluiu um conjunto de quatro primers (Tabela 6) um específico para cada filotipo no sentido forward (Nmult: 21:1 F, Nmult: 21:2 F, Nmult: 22: inf e Nmult: 23: AF) e um único e conservado primer reverso (Nmult: 22: RR) (Ji *et al.*, 2006). Esses primers têm como alvo a região espaçadora intergênica (ITS) entre as seqüências 16S e 23S (Figura 2). Essa reação produz os seguintes produtos: um fragmento amplificado de 144-pb em isolados pertencentes ao filotipo I, um fragmento de 372-pb para o filotipo II, um fragmento de 91-pb para o filotipo III e um fragmento amplificado de 213-pb para o filotipo IV. A reação continha 1X de tampão da *taq* polimerase, 0.25 mM de cada dNTP, 10 pmol de cada primer, 300 ng de DNA molde e 2.5 U de *taq* Polimerase (Invitrogen, LifeTechnologies) em um volume final de 50 µl. Como controle negativo da reação foi utilizado 49µL de uma reação sem o DNA molde. As PCRs foram realizadas no termociclador Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems) seguindo o seguinte protocolo: desnaturação inicial a 96°C por 3 min, 30 ciclos de 95°C por 30 s, 58°C por 30 s e 72°C por 30s e uma extensão final de 72°C por 10 min. Os produtos de PCR foram corridos em gel de agarose 2% e visualizados por coloração com brometo de etídio. O tamanhos dos fragmentos amplificados foram

estimados por comparação com o marcador molecular 1Kb plus DNA (Invitrogen, LifeTechnologies, Cergy-Pontoise, França).

A terceira PCR foi feita para amplificar e sequenciar porções do gene de endoglucanase (*egl*) A amplificação de uma região de aproximadamente 750-pb do gene *egl* foi realizada utilizando o par de primers Endo-F e Endo-R (Ji *et al.*, 2006). A reação em volume total de 50 μ L, continha o tampão fornecido pelo fabricante, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,25 mM de cada dNTP, 10 pmol de cada primer, 300 ng de DNA molde, e 1U de Taq polimerase platinum high fidelity (Invitrogen, LifeTechnologies, Cergy-Pontoise, França). A PCR foi realizada utilizando um termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems), seguindo o seguinte protocolo: desnaturação inicial a 96°C por 3 min, 30 ciclos de 95°C por 30 s, 69°C por 45 s e 72°C por 2 min e uma extensão final de 72°C por 10 min. Um volume de 5 μ L dos produtos da reação foi analisado por eletroforese através de géis de agarose 2%, e as bandas foram coradas em brometo de etídio. Os produtos frescos da PCR foram utilizados diretamente e a reação de sequenciamento foi realizada em ambos os sentidos (Forward e Reverse) com os primers Endo-F e Endo-R (Tabela 6) no sequenciador Prism 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems).

A última PCR realizada foi com o primer BOX (Costa *et al.*, 2006), um primer aleatório que se anela em diferentes lugares do DNA molde. Isso faz com que o produto tenha um padrão diferente de bandas para cada e isolado. A reação em volume total de 25 μ L, continha o tampão fornecido pelo fabricante, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,25 mM de cada dNTP, 10 pmol de cada primer, 50 ng de DNA molde, e 1U de Taq polimerase (Invitrogen, LifeTechnologies, Cergy-Pontoise, França). A PCR foi realizada utilizando um termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems), seguindo o seguinte protocolo: desnaturação inicial a 95° C por 7 min, 30 ciclos de 94° C por 1 min, 53° C por 1 min e 65° C por 8 min e uma extensão final de 65° C por 15 min. Os produtos da reação foram analisados por eletroforese através de géis de agarose 1,5%, e as bandas foram coradas em brometo de etídio. As imagens dos géis foram analisadas no software Bionumerics 5.1 (Applied Maths, Bélgica).

Tabela 6: Sequências dos primers utilizados para as análises moleculares de *Ralstonia solanacearum*.

Primer	Sequência	Referência
Filotipo		
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
Universal		
759-universal	5'-GTC GCC GTC AAC TCA CTT TCC-3'	Opina <i>et al</i> , 1997
760-universal	5'-GTC GCC GTC AGC AAT GCG GAA TCG-3'	Opina <i>et al</i> , 1997
Endoglucanase		
Endo-F	5'-ATG CAT GCC GCT GGT CGC CGC-3'	Ji <i>et al</i> , 2006
Endo-R	5'-GCG TTG CCC GGC ACG AAC ACC-3'	Ji <i>et al</i> , 2006
Box PCR		
Box	5'-CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G -3'	Versalovic <i>et al</i> , 1998

* S podem ser as bases C ou G

6. Análise das seqüências

Porções das seqüências do gene que codifica para a enzima endoglucanase (*egl*) (apêndice 2) localizado no megaplasmídeo foram analisadas usando o software livre MEGA 4.0 (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) (Tamura *et al.*, 2007). As seqüências foram alinhadas usando o programa para alinhamento múltiplo ClustalW (Larkin *et al.*, 2007) e depois o alinhamento foi ajustado manualmente.

As seqüências alinhadas foram analisadas através de duas das principais abordagens filogenéticas oferecidas pelo MEGA software. As relações evolutivas entre as seqüências foram computadas usando o algoritmo de Jukes & Cantor (Jukes & Cantor, 1969) e as árvores filogenéticas foram construídas a partir da distância genética de dados usando o método Neighbor Joining (NJ) (Saitou & Nei, 1987) com 5.000 repetições de bootstrap dos dados para testar as topologias das árvores.

6. RESULTADOS

RESULTADOS

Análise morfológica

Os resultados de análise morfológica mostraram variedade para os três parâmetros analisados – produção de melanina, quantidade de muco e tamanho da colônia (Figura 5). A maioria dos isolados não produz melanina e não foi observada nenhuma relação entre os parâmetros analisados (Tabela 7). Existem isolados que produzem muito muco e que produzem melanina e isolados que não produzem muco e que também produzem melanina (Figura 5).

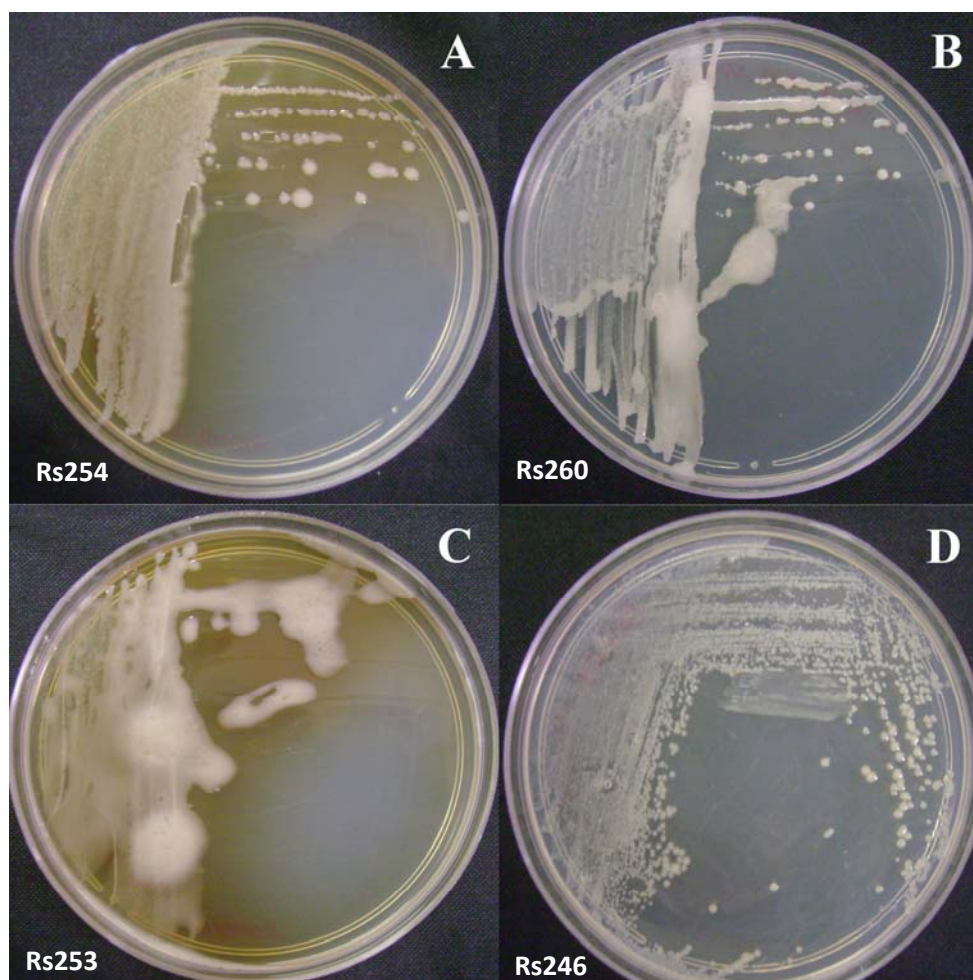


Figura 5: Exemplo de isolados de *Ralstonia solanacearum* com diferentes características morfológicas. (A) Isolado produtor de melanina e pouca quantidade de muco. (B) Isolado não produtor de melanina e muita quantidade de muco. (C) Isolado produtor de melanina e muita quantidade de muco. (D) Isolados não produtor de melanina e pouca quantidade de muco.

Tabela 7: Características morfológicas dos isolados de *Ralstonia solanacearum* crescidos em meio Kelman ágar por 96 horas.

Isolado	Melanina	Muco	Tamanho da Colônia
GMI 1000	não	*	Muito Pequena
UW 151	não	***	Médio
UW 443	não	*	Pequena
UW 373	não	*	Muito Pequena
UW 363	não	***	Médio
UW 386	não	**	Médio
K 60	sim	*	Pequena
RS 02	não	*	Pequena
RS 12	não	*	Pequena
RS 23	não	*	Muito Pequena
RS 26	não	*	Muito Pequena
RS 27	não	**	Pequeno
RS 28	sim	*	Muito Pequena
RS 30	não	*	Pequena
RS 44	não	**	Pequena
RS 59	não	**	Médio
RS 66	não	*	Médio
RS 67	não	**	Pequena
RS 68	não	*	Muito Pequena
RS 69	não	*	Muito Pequena
RS 71	não	*	Pequena
RS 77	não	**	Pequena
RS 81	não	**	Médio
RS 82	não	**	Pequena
RS 83	não	**	Médio
RS 84	não	***	Médio
RS 87	não	*	Pequena
RS 89	não	***	Médio
RS 90	sim (pouca)	*	Muito Pequena
RS 91	não	*	Pequena
RS 92	não	*	Pequena
RS 94	não	***	Pequena
RS 95	não	***	Pequena
RS 96	não	*	Médio
RS 98	não	*	Pequena
RS 99	não	*	Médio
RS 113	sim	**	Médio
RS 115	sim	*	Pequena
RS 121	sim	***	Médio
RS 131	sim	*	Pequena
RS 134	não	*	Muito Pequena
RS 139	não	*	Pequena
RS 141	sim	**	Médio
RS 145	não	*	Pequena
RS 156	não	***	Pequena
RS 157	não	*	Pequena
RS 161	não	*	Pequena
RS 201	não	*	Pequena
RS 202	não	**	Pequena
RS 203	não	*	Muito Pequena
RS 204	não	*	Pequena
RS 205	sim	**	Médio
RS 213	não	*	Pequena
RS 231	não	**	Médio
RS 240	sim	**	Médio
RS 241	sim	***	Grande
RS 242	sim	*	Muito Pequena
RS 243	não	***	Médio
RS 244	não	**	Muito Pequena

RS 245	não	*	Muito Pequena
RS 246	não	*	Pequena
RS 252	sim	***	Pequena
RS 253	sim	***	Médio
RS 254	sim	*	Médio
RS 260	não	**	Pequena
RS 261	não	***	Médio

(*) Nenhuma produção de muco (**) Média quantidade de muco (***) Muita quantidade de muco

Classificação em biovar 2A e 2T

Foi determinada a identificação em biovar dos 60 isolados de batata, berinjela e pimentão de acordo com a sua capacidade para utilizar sorbitol, manitol, e dulcitol e para oxidar lactose, maltose e celobiose (Hayward, A.C., 1994). Depois de 3 semanas, as placas incubadas a 28°C, foram avaliadas as mudanças de coloração de verde para amarelo. Essa mudança ocorre devido a presença de um indicador de pH, o azul de bromotimol, que em solução ácida fica amarelo, em solução básica fica azul e em solução neutra fica verde (Mendham *et al.*, 1981). Por isso, quando a bactéria consome o substrato acidifica o meio e a cor muda de verde para a amarelo, se não há consumo a cor e por sua vez o pH do meio se mantém verde.

Para todos os isolados, a cor amarela apareceu nos poços onde havia açúcares como substratos; onde havia álcool não houve mudança de cor. Esse resultado indicou que todos os isolados pertencem à biovar 2 (Hayward, A.C., 1994).

A seguir, foi determinada também a identificação desses isolados em biovar 2A ou 2T. Após 10 dias de incubadas, as placas mostraram as mudanças de coloração do verde para o amarelo indicando a qual biovar pertenciam. A maioria, 44 dos 60 isolados, apresentou coloração amarela tanto para inositol quanto para trealose, indicando assim que pertencem ao grupo da biovar 2T. O restante dos isolados, apresentou a mudança apenas para um dos substratos sendo, portanto classificados como biovar 2A (Tabela 2), segundo mostrado por (Hayward, A.C., 1994).

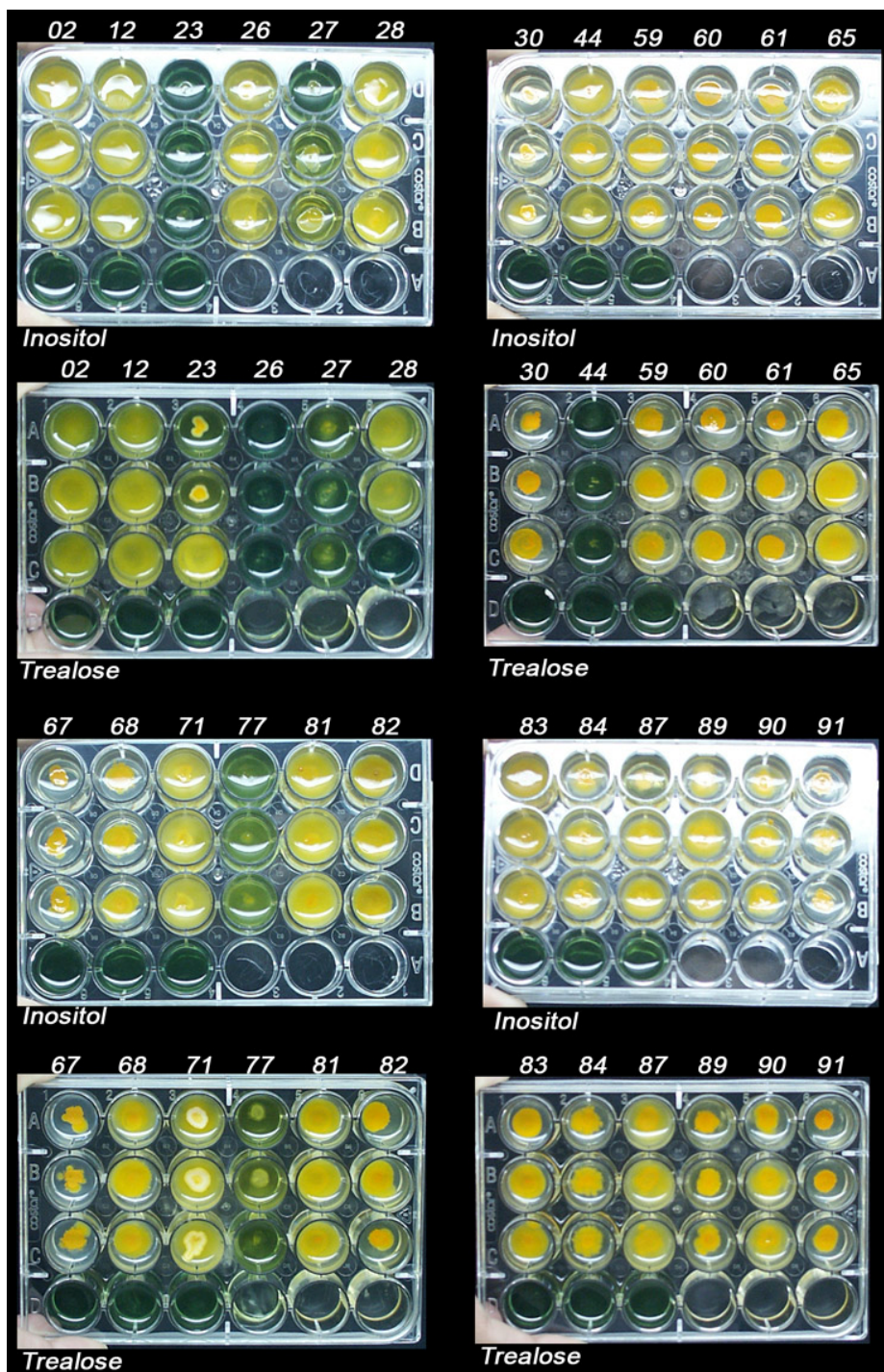


Figura 6: Resultados dos testes de *Ralstonia solanacearum* para biovar 2A e 2T. Os isolados no qual tanto inositol quanto trealose ficaram amarelos foram classificados como biovar 2T e os isolados onde apenas um dos substratos ficou amarelo foi classificado como biovar 2A. Os números correspondem aos isolados e cada um foi feito em triplicata.

PCR multiplex para filotipo

A classificação em filotipos, realizada através de uma PCR multiplex, indicou que 59 dos isolados apresentaram fragmento amplificado correspondente ao filotipo II (372 pb) (Figura 7), (Fegan & Prior, 2005; Prior & Fegan, 2005). O isolado Rs199, obtido de pimentão em Brasília foi a única exceção dessa coleção. O fragmento amplificado para esse isolado foi correspondente ao filotipo IV (Figura 8).

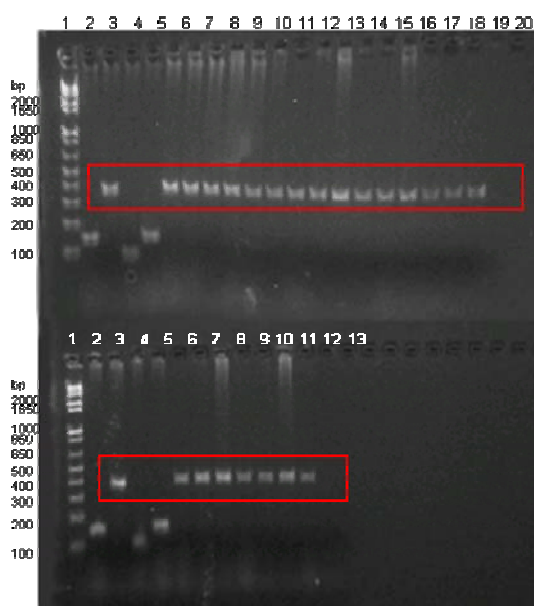


Figura 7: Resultado da PCR multiplex para filotipo dos isolados de *Ralstonia solanacearum*. Os isolados tiveram o fragmento amplificado correspondente ao filotipo II. Poços superiores: 1-Marcador 1kb plus, 2- UW363 (filotipo I), 3- K60(filotipo II), 4- UW386 (filotipo III), 5- UW443 (filotipo IV), 6- RS02, 7- RS12, 8- RS23, 9- RS30, 10- RS44, 11- RS59, 12- RS60, 13- RS61, 14- RS65, 15- RS66, 16- RS68, 17- RS69, 18- RS71, 19- RS77, 20- RS81. Poços inferiores: 1-Marcador 1 kb plus, 2- UW363, 3- K60, 4- UW386, 5-UW443, 6- RS82, 7- RS83, 8- RS90, 9- RS92, 10- RS96, 11- RS98, 12- RS99, 13- Controle -.

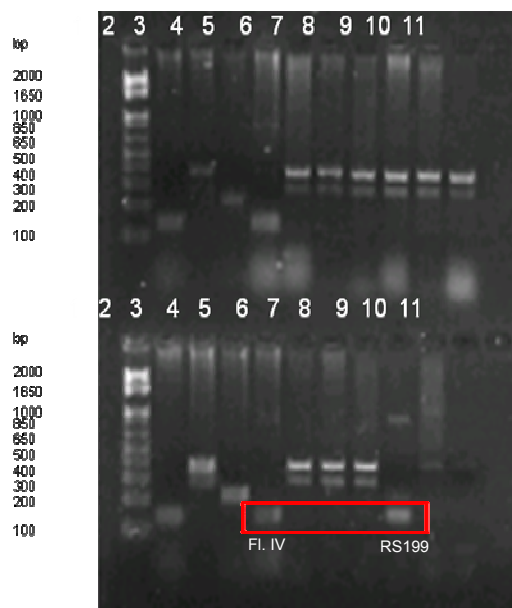


Figura 8: Resultado da PCR multiplex para filotipo dos isolados de *Ralstonia solanacearum*. O isolado Rs 199 teve o fragmento amplificado correspondente ao filotipo IV. Poços superiores: 1-Marcador 1kb plus, 2- UW363 (filotipo I), 3- K60(filotipo II), 4- UW386 (filotipo III), 5- UW443 (filotipo IV), 6- RS26, 7- RS28, 8- RS134, 9- RS139, 10- RS141, 11- RS145. Poços inferiores: 1-Marcador 1kb plus, 2- UW363, 3- K60, 4- UW386, 5-UW443, 6- RS156, 7- RS157, 8- RS161, 9- RS199, 10- RS232, 11- Controle -.

Sequência do gene endoglucanase (*egl*)

As sequências parciais do gene endoglucanase (apêndice 2) foram geradas a partir de um conjunto de isolados de *R. solanacearum* representativas do Brasil, todas pertencentes à biovar 2. Como mostrado por Wicker *et al.* (2007), árvores construídas por outros métodos filogenéticos como máxima verossimilhança, máxima parcimônia e inferência Bayesiana, são totalmente congruentes com o método Neighbor Joining (NJ). Portanto, apenas a árvore filogenética de NJ, com os valores de *bootstrap* é apresentada (

Figura 9). Na árvore filogenética apresentada baseada nas sequências de *egl*, os quatro filotipos ficaram claramente separados, semelhante ao resultado obtido por Wicker *et al.* (2007). Os isolados de referência para os filotipos I (R292, UW151, GMI1000 e JT523), III (CFBP3059 e NCPPB332) e IV (MAFF301558 e PSI7), ficaram agrupados separadamente, com valores altos de *bootstrap*. As sequências de referência para filotipo II, tais como CIP309, JT516, MOLK2, UW129 e K60 ficaram agrupadas em conjunto com os isolados

brasileiros classificados por PCR multiplex como filotipo II. Dentro do grupo das sequências dos isolados que foram classificados como filotipo II os isolados foram separados em dois ramos, um contendo os isolados Rs145 de batata isolado em Minas Gerais e o isolado Rs 201 de pimentão isolado em Brasília. Esses isolados se agruparam com as referências da sequevar 5. O outro grupo maior contém os outros isolados e todos ficaram agrupados juntamente com as referências da sequevar 1. Grande parte dos isolados têm a mesma sequência, não havendo distância filogenética entre eles.

Todas as sequências do gene de endoglucanase foram depositadas no banco de dados Gene Bank com os seguintes números de acesso: Rs02:GU049781, Rs12:GU049782, Rs23:GU049783, Rs26:GU049784, Rs27:GU049785, Rs28:GU049786, Rs30:GU049787, Rs44:GU049788, Rs59:GU049789, Rs66:GU049790, Rs67:GU049791, Rs68:GU049792, Rs69:GU049793, Rs71:GU049794, Rs77:GU049795, Rs81:GU049796, Rs82:GU049797, Rs83:GU049798, Rs84:GU049799, Rs87:GU049800, Rs89:GU049801, Rs90:GU049802, Rs91:GU049803, Rs92:GU049804, Rs95:GU049805, Rs96:GU049806, Rs98:GU049807, Rs113:GU049808, Rs115:GU049809, Rs121:GU049810, Rs131:GU049811, Rs134:GU049812, Rs139:GU049813, Rs145:GU049814, Rs157:GU049815, Rs161:GU049816, Rs201:GU049817, Rs202:GU049818, Rs203:GU049819, Rs204:GU049820, Rs205:GU049821, Rs231:GU049822, Rs242:GU049823, Rs243:GU049824, Rs244:GU049825, Rs245:GU049826, Rs246:GU049827, Rs252:GU049828, Rs253:GU049829, Rs254:GU049830, Rs260:GU049831, Rs261:GU049832, Rs141:GU049833, Rs156:GU049834, Rs241:GU049835, Rs94:GU049836, Rs99:GU049837, Rs213:GU049838, Rs240:GU049839

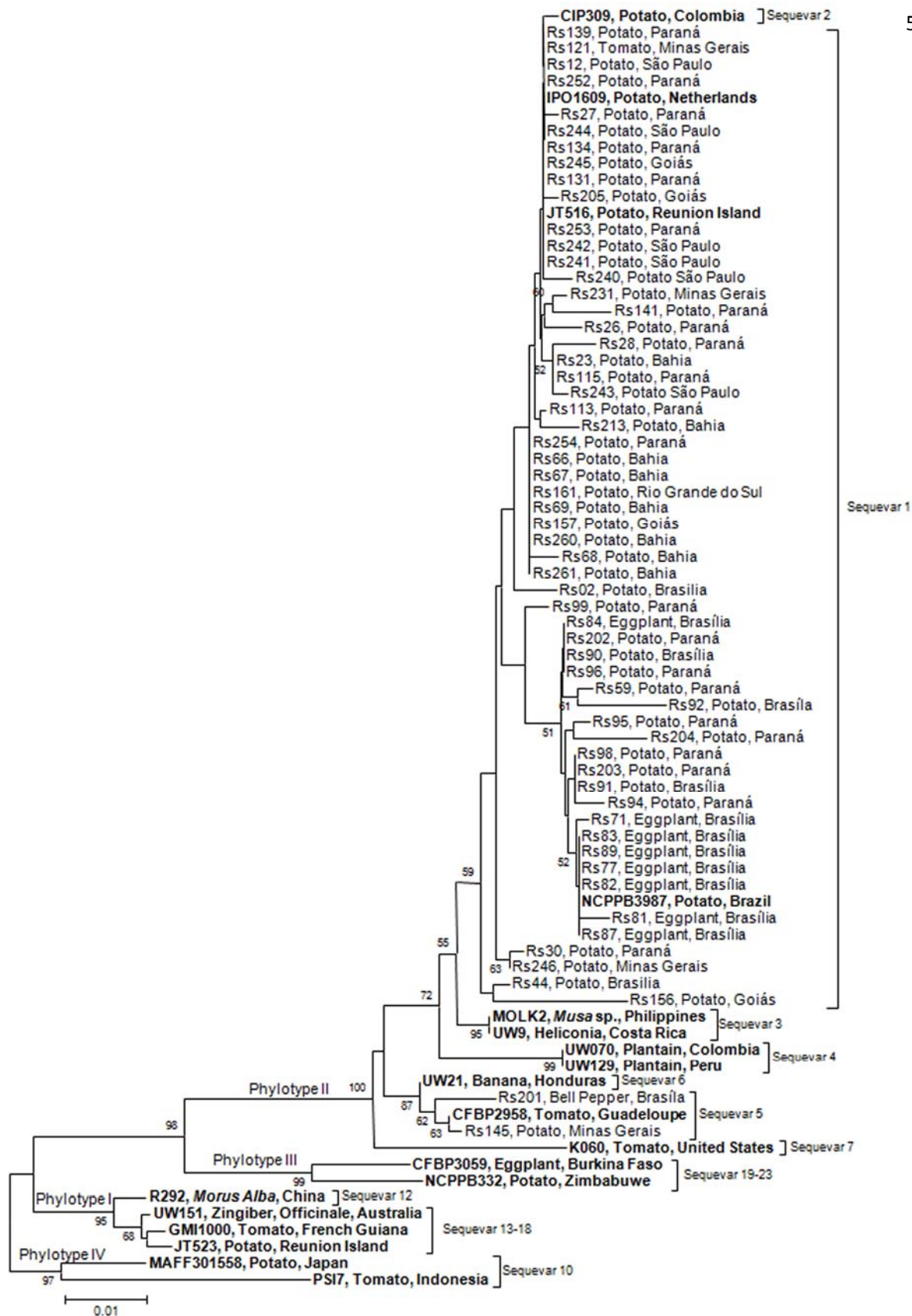


Figura 9: Árvore filogenética (NJ) baseada na sequência parcial do gene de endoglucanase (*egl*) de diversos isolados de *Ralstonia solanacearum*. O número em cada nó é o valor do bootstrap (5000 repetições). A árvore foi enraizada construída utilizando o software Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA). A barra representa 1 substituição de nucleotídeo para cada 100 nucleotídeos.

Box-PCR

Os padrões de *fingerprint* gerados pela BOX-PCR dos 60 isolados brasileiros de *R. solanacearum* (Figura 10) foram utilizados para calcular um coeficiente de similaridade através do software Bionumerics 5,0 e usado para construir um dendrograma (Figura11). Os isolados de referência para os filotipos I (UW151, UW363, GMI1000), III (UW386) e IV (UW443) (Ji *et al.*, 2006) foram agrupados em um cluster separado dos isolados deste estudo, que pertencem ao filotipo II. Os isolados deste estudo foram agrupados com o isolado de referência K60, que também pertence ao filotipo II.

Dentro do grande grupo dos isolados pertencentes ao filotipo II, é possível notar uma separação de grupos por região de coleta. É possível notar facilmente três grupos: um de isolados de Ibicoara (BA), um grupo de isolados de Castro (PR) e um grupo de Brasília (DF). Muitos dos isolados brasileiros de *R. solanacearum* ficaram agrupados não apenas em função da localização geográfica onde as amostras foram coletadas, mas também em função a data da coleta (Figura 11). Por exemplo, os isolados de Brasília (DF) coletadas em 1992, ficaram agrupados e separados das outros isolados de Brasília coletados em 1987 e 1989. Também houve uma separação dos grupos por hospedeiro. Os isolados patogênicos à berinjela foram agrupados separados dos de batata.

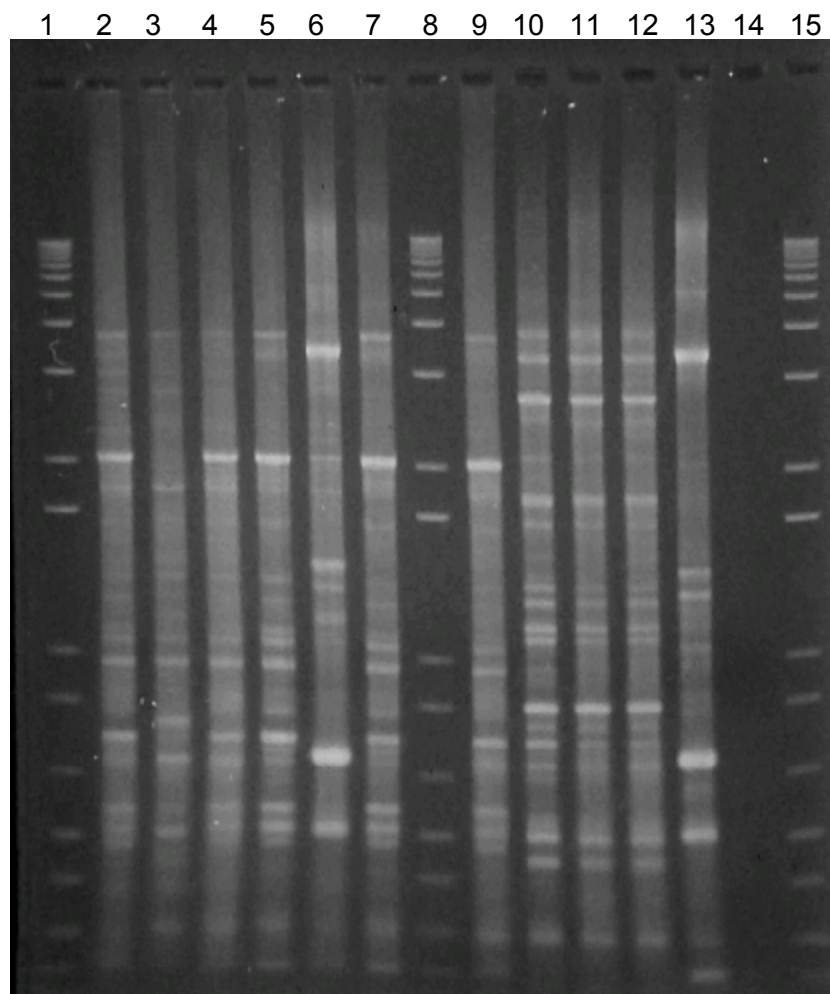


Figura 10: Padrão de bandas de isolados de *Ralstonia solanacearum* obtido através PCR feita com o primer Box.1-Marcador 1Kb plus, 2-RS71, 3-RS77, 4-RS82, 5-RS83, 6-RS84, 7-RS87, 8-Marcador 1Kb plus, 9-RS89, 10-RS90, 11-RS91, 12-RS92, 13-RS94, 14-Controle negativo, 15-Marcador 1Kb plus.

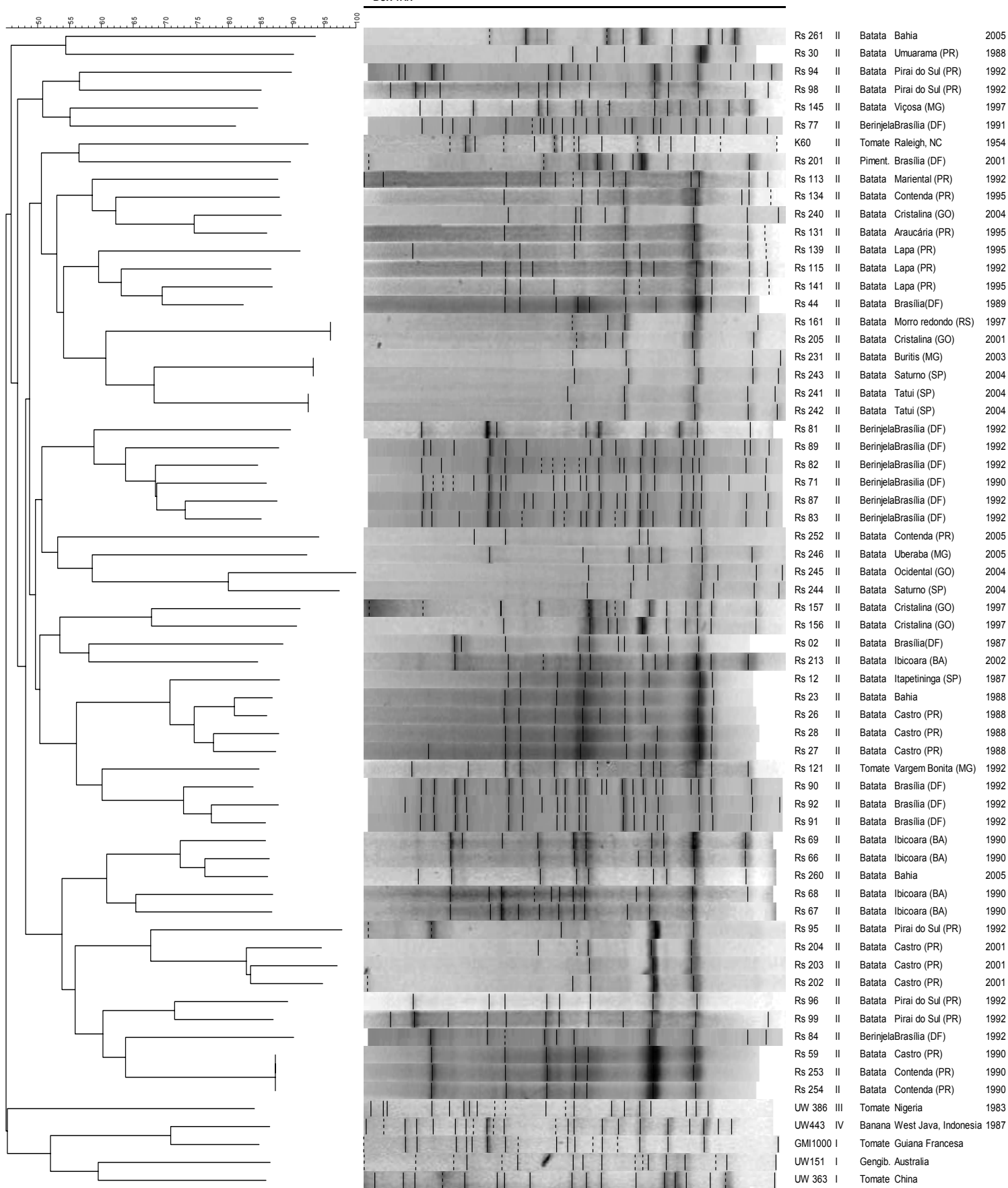


Figura 11:Árvore construída pelo método de Neighbor Joining (NJ) com base no padrão de bandas de cada isolado após uma PCR com o primer Box. O software utilizado foi o Bionumerics A barra na parte superior da figura indica o índice de similaridade entre os isolados.

7. DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Ralstonia solanacearum é uma bactéria cosmopolita, extremamente variável, adaptada a um grande número de plantas hospedeiras, sob as mais diversas condições edafoclimáticas (Takatsu & Lopes, 1997). Isso faz com que o patógeno adapte-se facilmente às condições do hospedeiro e do clima na qual ela está inserida. Os resultados de análise morfológica mostram essa variação que o patógeno possui. Nesse caso, especificamente a variação fenotípica. Dos parâmetros analisados a quantidade de muco produzido é o mais fortemente relacionado com a patogenicidade do isolado (Denny & Baek, 1990). Foi mostrado que mutantes que são reduzidos na produção de polissacarídeos extracelulares (muco) podem provocar sintomas de murcha, mas a uma taxa inferior ao selvagem (Kao *et al.*, 1992). Já a função da melanina ainda não é muito clara, mas existem hipóteses de que estaria relacionada à proteção contra os raios solares (Hernandez-Romero *et al.*, 2005). Uma vez que esses resultados mostram que existe uma grande variação fenotípica entre os isolados de *R. solanacearum*, eles corroboram a hipótese de *R. solanacearum* não ser uma espécie e sim um complexo específico.

R. solanacearum é um patógeno pertencente a um grupo heterogêneo, com uma grande variedade de hospedeiros. A definição e separação dos subgrupos dentro do complexo de espécies *R. solanacearum* é bastante importante já que pode ser uma ferramenta que ajuda a prever a susceptibilidade do hospedeiro e a patogenicidade. Vários estudos revelam essa diversidade de plantas hospedeiras (Yu *et al.*, 2003; Ji *et al.*, 2006; Ivey *et al.*, 2007; Jeong *et al.*, 2007; Wicker *et al.*, 2007; Norman *et al.*, 2009).

O diagnóstico para discriminar subgrupos relevantes de *R. solanacearum* é um desafio por causa da heterogeneidade dos hospedeiros, da complexidade e da especificidade dos hospedeiros para alguns isolados do patógeno. A detecção específica e precisa do agente causador da doença é essencial para a proteção de culturas suscetíveis. Por exemplo, os isolados da raça 3, que são patogênicas para batata, exigem um controle rigoroso em regiões produtoras de batata. Na verdade, as linhagens da Raça 3 biovar 2 são

consideradas como um possível agente de bioterrorismo nos Estados Unidos (Lambert, 2002). Estima-se que a murcha bacteriana seja responsável por perdas de quase um bilhão de dólares por ano em cerca de 40 países. No Brasil, essa doença pode causar perdas de mais de 50% da produção nas culturas de batata (Lopes, 2005). Portanto, a caracterização de isolados responsáveis por surtos pode orientar as políticas para a quarentena de materiais importados e a extensão das medidas tomadas para prevenir e combater a disseminação do patógeno para outras áreas do país.

Testes fisiológicos clássicos para a classificação dos 60 isolados brasileiros de *R. solanacearum* em biovars foram realizados. Todos os isolados testados foram classificados como pertencentes ao grupo da biovar 2, sendo que a maioria (~70%) são pertencentes à biovar 2T, que é a biovar mais comum em áreas próximas dos trópicos (Hayward, A.C., 1994). Esse não era um resultado esperado, uma vez que, os isolados 2T não deveriam estar presentes no Paraná, pois a área de plantio de batata nessa região possui temperaturas mais amenas, portanto mais propensa a adaptação de isolados biovar 2A. Isto pode sugerir que a origem dos isolados patogênicos para batata no Brasil é uma área tropical ou essa disseminação de variedades ser devido a sua disseminação via batata-semente produzida no sul do país.

Estudos recentes têm utilizado dados moleculares para classificar isolados de *R. solanacearum* que foram isoladas em uma variedade de espécies hospedeiras de diferentes partes do mundo em subgrupos (Jaunet & Wang, 1999; Ji *et al.*, 2006; Ivey *et al.*, 2007; Jeong *et al.*, 2007; Wicker *et al.*, 2007). Este estudo com 60 isolados brasileiros da biovar 2 revelou que todos pertencem ao filotipo II, corroborando os resultados anteriores (Fegan & Prior, 2005; Prior & Fegan, 2005) os quais sugerem a prevalência deste filotipo nas Américas. Entretanto, a única exceção foi o isolado Rs199, cujo fragmento amplificado do ITS correspondeu ao filotipo IV, indicando uma possível origem estrangeira (Indonésia) para esse isolado. É importante ressaltar que este isolado foi obtido de um centro de pesquisa (Embrapa – Hortaliças), que frequentemente recebe material de várias partes do mundo.

Como demonstrado em plantas de batata infectadas com isolados biovar 2 na Coréia (Jeong *et al.*, 2007). A situação predominante que se encontrou nesse estudo é de que o filotipo II se mostra mesmo mais prevalente nas Américas, uma vez que apenas um isolado de pimentão foi estudado e só ele foi discrepante do restante do grupo. No entanto, é necessário um estudo maior com mais isolados de pimentão para que se analise a situação desse isolado.

Em muitos estudos moleculares, a sequência do gene que codifica a enzima endoglucanase tem sido utilizada como uma eficiente ferramenta para determinar as relações filogenéticas entre os isolados de *R. solanacearum*. Teoricamente, não seria esperado que esse gene fosse ser eficiente para a análise filogenética já que os isolados pertencem à mesma "espécie" e este é um gene que codifica para um produto funcional. A variação nucleotídica esperada para este tipo de situação é pequena (Nei & Kumar, 2000). No entanto, o gene da endoglucanase apresentou uma variação de sequência suficiente para diferenciar os isolados de *R. solanacearum* de forma eficiente. Algumas das características importantes sobre esse gene que permitiram a sua utilização para este fim específico são o fato de que o gene endoglucanase é cópia única no genoma e o fato de que é um gene conservado (Fegan & Prior, 2005), com alguma variação, pois é altamente relacionado com a virulência do patógeno (Roberts *et al.*, 1988). Conforme mostrado na árvore filogenética (

Figura 9) e em outros estudos (Ji *et al.*, 2006; Jeong *et al.*, 2007; Wicker *et al.*, 2007; Norman *et al.*, 2009), esta variação parece estar relacionada com o hospedeiro do patógeno, uma vez que os isolados da mesma espécie de hospedeiro tendem a ser agrupados nos mesmos clusters.

A árvore filogenética baseada na sequência do gene *egl* que separa os diferentes isolados em filotipos apresentadas neste estudo está de acordo com os trabalhos anteriores (Fegan & Prior, 2005; Ji *et al.*, 2006; Wicker *et al.*, 2007). Todas as sequências analisadas neste estudo ficaram agrupadas em filotipos e sequevares existentes. Este resultado

demonstra a solidez dos sistemas de classificação propostos, baseado no tamanho do ITS (filotipos) e na sequência do gene de endoglucanase (sequevares). A análise filogenética baseada na sequência do gene *egl* apresentada neste estudo indica que há pouca diversidade genética para o gene da endoglucanase entre os isolados brasileiros raça 3 biovar 2, que ficaram em sua maioria agrupados com isolados conhecidos da sequevar 1 (

Figura 9). Somente um isolado patogênico a batata, Rs 145, e um de pimentão, Rs 201, ficaram agrupados com a sequevar 5. Os isolados estrangeiros utilizados neste estudo como referência para os outros filotipos e sequevares ficaram agrupados em clados diferentes das variedades brasileiras com altos valores de bootstrap. Como os resultados previamente publicados (Fegan & Prior, 2005), na nossa árvore sequevares 1 e 2 são considerados altamente relacionados.

Semelhantes aos resultados obtidos com a sequência do gene *egl*, os padrões de *fingerprint* gerados pela BOX-PCR permitiram a separação de filotipos. Além disso, a Figura 11 mostra uma clara separação em clusters pelo local onde o isolado foi obtido e a data em que foi isolado. Portanto, BOX-PCR foi um método rápido e útil não só para separar filotipos, mas também deu provas da existência de linhagens clonais. Esse resultado foi diferente do encontrado por Silveira *et al* (2005) que não obteve uma separação clara de isolados de batata pelas técnicas de rep-PCR e RFLP. Os resultados BOX-PCR não separaram os dois isolados, Rs 145 e Rs 201, que foram agrupados com a sequevar 5 na análise filogenética baseada no *egl*. Portanto, a análise filogenética baseada na sequência *egl* foi mais criteriosa, pois ela conseguiu separar os isolados da sequevar 5 e o Box-PCR não foi capaz de separar esse grupo.

Em conclusão, a utilização dos métodos de classificação em filotipos e sequevares propostos por Fegan & Prior (2005) com base em ferramentas moleculares foi aplicada para caracterizar um grupo de 60 isolados de *R. solanacearum*, em sua maioria isolados patogênicos a batata. Este estudo corrobora estudos anteriores que mostram o filotipo II

associado com as Américas. Neste estudo inicial foi mostrado que os isolados geograficamente relacionados também são filogeneticamente relacionados.

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

PERSPECTIVAS FUTURAS

- ✓ Não há como afirmar se estes isolados possuem hospedeiros similares, além da batateira. Ainda é necessário fazer teste de patogenicidade com plantas de batata e outras solanáceas.
- ✓ A coleção de amostras utilizada neste estudo é representativa do Sul e Sudeste do Brasil, que é a principal região produtora de batata. Estudos adicionais com isolados patogênicos a outros hospedeiros do Norte e a maioria dos estados do Centro-Oeste são necessários para que se tenha uma maior visualização da distribuição dos filotipos e sequências no Brasil.
- ✓ É necessário que se faça um estudo com outros isolados patogênicos a pimentão para que se tenha uma melhor ideia da real situação do isolado Rs199.
- ✓ É interessante que se faça estudos populacionais com outros genes, para analisar se esse padrão evolutivo é exclusivo do *egl* ou se aplica a mais genes.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Baldwin, B. G. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: An example from the Compositae. Molecular Phylogenetics and Evolution, v.1, p.3 - 16. 1992.

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

Chellapadi, P. e Himanshu, M. Production of endoglucanase by the native strains of *Streptomyces* isolates in submerged fermentation. Brazilian Journal of Microbiology, v.39, p.122 – 127. 2008.

Costa, S. B., Ferreira, M. A. S. V. e Lopes, C. A. Diversidade patogênica e molecular de *Ralstonia solanacearum* da região amazônica brasileira. Fitopatologia Brasileira, v.32, n.4, p.285-294. 2007.

Denny, T. A short history of biochemical and genetic research on *Ralstonia solanacearum* pathogenesis. In: Allen, C., Prior, P. e Hayward, A. C. (Ed.). Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. St, Paul, MN: APS press, 2005. p.323 - 334.

Denny, T. P. e Baek, S.-R. Genetic evidence that extracellular polysaccharide is a virulence factor of *Pseudomonas solanacearum*. Molecular plant-microbe interactions, v.4, n.2, p.198 - 206. 1990.

Fegan, M. e Prior, P. How complex is the "Ralstonia solanacearum species complex?". In: C. Allen, P. Prior e A. C. Hayward (Ed.). Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. St. Paul, MN: APS press, 2005. p.449 - 461.

Genin, S. e Boucher, C. Pathogen Profile: *Ralstonia solanacearum*. Molecular Plant Pathology, v.33, p.111 – 118. 2002.

Genin, S. e Boucher, C. Lessons learned from the genome analysis of *Ralstonia solanacearum*. Annu Rev Phytopathol, v.42, p.107-134. 2004.

Gillings, M. R. e Fahy, P. Genomic fingerprinting: towards a unified view of the *Pseudomonas solanacearum* species complex. In: Hayward, A. C. H., G.L. (Ed.). Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*: Wallingford: CAB International, 1994. p.95 - 112

González, E. T. e Allen, C. Characterization of a *Ralstonia solanacearum* operon required for polygalacturonate degradation and uptake of galaturonic acid. The American Phytopathological Society, v.16, n.6, p.536 - 544. 2003.

Grey, B. E. e Steck, T. R. The viable but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* may be involved in long-term survival and plant infection. Appl Environ Microbiol, v.67, n.9, Sep, p.3866-3872. 2001.

Griffiths, A. J. F., Miller, J. H., Suzuki, D. T., Lewontin, R. C. e Gelbart, W. M. Introdução à genética. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2006. 743 p.

Guidot, A., *et al.* Specific genes from the potato brown rot Strains of *Ralstonia solanacearum* and their potential use for strain detection. *Phytopathology*, v.99, n.9, Sep, p.1105-1112. 2009.

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

Hayward, A. C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu Rev Phytopathol*, v.29, p.65-87. 1991.

Hayward, A. C. The hosts of *Pseudomonas solanacearum* In: Hayward, A. C.; Hartman, G. L. (eds) Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. Wallingford: CAB International, p. 9 – 24. 1994.

Hayward, A. C. Systematics and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. In: Hayward, A. C. e Hartman, G. L. (Ed.). Bacterial wilt: The disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. Wallingford: CAB, 1994. p.123-135

Hernandez-Romero, D., Solano, F. e Sanchez-Amat, A. Polyphenol oxidase activity expression in *Ralstonia solanacearum*. *Applied Environmental Microbiology*, v.71, n.11, Nov, p.6808-6815. 2005.

Ho, G.-D. e Yang, C.-H. A single locus leads to resistance of *Arabidopsis thaliana* to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* through e hypersensitive-like response. *The American Phytopathological Society*, v.89, n.8, p.673 - 678. 1999.

Horita, M. e Tsuchiya, K. Genetic diversity of Japanese strains of *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology*, v.91, p.399-407. 2001.

Ivey, M. L., Gardener, B. B. M., Opina, N. e Miller, S. A. Diversity of *Ralstonia solanacearum* Infecting Eggplant in the Philippines. *Phytopathology*, v.97, n.11, Nov, p.1467-1475. 2007.

Jabuonski, R. E. e Hidalgo, O. A. Doencas bacterianas. In: Reifschneider, F. J. B. (Ed.). *Produção de batata*. Brasília: Linha Gráfica, 1987. p.85-93

Jaunet, T. X. e Wang, J.-F. Variation in Genotype and Agressiveness of *Ralstonia solanacearum* Race 1 Isolated from Tomato in Taiwan. *Phytopathology*, v.89, n.4, p.320 - 327. 1999.

Jeong, Y., Kim, J., Kang, Y., Lee, S. e Hwang, I. Genetic diversity and distribution of Korean isolates of *Ralstonia solanacearum*. *Plant Disease*, v.91, n.10, p.1277 - 1287. 2007.

Ji, P., Allen, C., Yao, J., Elphinstone, J. G., Jones, J. B. e Momol, M. T. New Diversity of *Ralstonia solanacearum* Strains Associated with Vegetable and Ornamental Crops in Florida. *Plant Disease*, v.91, n.2, p.195 - 203. 2006.

Jukes, T. H. e Cantor, C. R. Evolution of protein molecules. In: Munro, H. N. (Ed.). *Mammalian protein metabolism*. New York, NY: Academic Press, 1969. p.21–132

Kao, C. C., Barlow, E. e Sequeira, L. Extracellular polysaccharide is required for wild-type virulence of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Bacteriology*, v.174, n.3, p.1068-1071. 1992.

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

Lambert, C. D. Agricultural Bioterrorism Protection Act of 2002: Possesion, Use and Transfer of Biological Agents and Toxins; Interim and Final Rule. Register, F. 67: 76908-76938 p. 2002.

Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., Mcgettigan, P. A., Mcwilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J. e Higgins, D. G. ClustalW and ClustalX version 2. Bioinformatics, v.23, n.21, p.2947-2948. 2007.

Liu, H., Zhang, S., Schell, M. A. e Denny, T. P. Pyramiding Unmarked Deletions in *Ralstonia solanacearum* shows that secreted proteins in addition to plant cell-wall-degrading enzymes contribute to virulence. Molecular Plant-microbe Interactions, v.18, n.12, p.1296-1305. 2005.

Lopes, C. A. Ecologia de *Pseudomonas solanacearum*. In: (Ed.). Taller sobre enfermidades bacterianas de la papa 1 Brasília: Memórias... Brasília: Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças/ EMBRAPA, 1994. p.17 – 22

Lopes, C. A. Murchadeira da Batata. Itapetininga-SP: Associação Brasileira da Batata. 2005. 68 p.

Mapa. Agronegócio Brasileiro: Uma Oportunidade de Investimentos. 2004. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/>. Acessado em: 20/07/2009

Mendham, J., Denney, R. C., Barnes, J. D. e Thomas, M. J. K. Vogel: Análise Química Quantitativa. Rio de Janeiro: Guanabara Dois. 1981. 690 p.

Nei, M. e Kumar, S. Molecular evolution and phylogenetics. New York: Oxford University Press. 2000

Netto, R. A. C., Pereira, B. G., Noda, H. e Boher, B. Caracterização de isolados de *Ralstonia solanacearum* Obtidos de tomateiros em várzea e em terra firme, no estado do Amazonas. Fitopatologia Brasileira, v.28, p.362-366. 2003.

Norman, D. J., Zapata, M., Gabriel, D. W., Duan, Y. P., Yuen, J. M., Mangravita-Novo, A. e Donahoo, R. S. Genetic diversity and host range variation of *Ralstonia solanacearum* strains entering North America. Phytopathology, v.99, n.9, Sep, p.1070-1077. 2009.

Opina, N., Tavner, F., Hollway, G., Wang, J. F., Li, T. H., Maghirang, R., Fegan, M., Hayward, A. C., Krishnapillai, V., Hong, W. F., Holloway, B. W. e Timmis, J. A novel method for development of species and strain specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (for merly *Pseudomonas solanacearum*). Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology, v.5, p.19-30. 1997.

Palleroni, N. J. e Doudoroff, M. Phenotypic characterization and deoxyribonucleic acid homologies of *Pseudomonas solanacearum* Journal of Applied Bacteriology, v.107, p.690 - 696. 1971.

Prior, P. e Fegan, M. Recent developments in the phylogeny and classification of *Ralstonia solanacearum*. Acta Horticulturae, v.695, p.127-136. 2005.

Reifschneider, F. J. B. e Takatsu, A. *Pseudomonas solanacearum* no Brasil: Aspectos macroepidemiológicos. Fitopatologia Brasileira, v.10, n.2, p.213. 1985.

Roberts, D. P., Denny, T. P. e Schell, M. A. Cloning of the egl gene of *Pseudomonas solanacearum* and analysis of its role in phytopathogenicity. Journal of Bacteriology, v.170, p.1445–1451. 1988.

Saitou, N. e Nei, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution, v.4, p.406-425. 1987.

Salanoubat, M., Genin, S., Artiguenave, F., Gouzy, J., Mangenot, S., Arlat, M., Billault, A., Brottier, P., Camus, J. C., Cattolico, L., Chandler, M., Choisine, N., Claudel-Renard, C., Cunnac, S., Demange, N., Gaspin, C., Lavie, M., Moisan, A., Robert, C., Saurin, W., Schiex, T., Siguier, P., Thebault, P., Whalen, M., Wincker, P., Levy, M., Weissenbach, J. e Boucher, C. A. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. Nature, v.415, n.6871, Jan 31, p.497-502. 2002.

Salles-Filho, S. e Bonacelli, M. B. Biotechnologia transforma bases da pesquisa agrícola 2003. Disponível em: <http://www.comciencia.br/reportagens/agronegocio/15.shtml>. Acessado em: 19/08/2009

Sambrock, J., Fritsch, E. F. e Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989. 2344p.

Silveira, J. R. P., Duarte, V., Moraes, M. G., Oliveira, A. M. R., Barni, V. e Macie, J. L. N. Caracterização de estirpes de *Ralstonia solanacearum* isoladas de plantas de batata com murcha bacteriana, por PCR-Rep e RAPD. Fitopatologia Brasileira, v.30, p.615-622. 2005.

Swanson, J. K., Yao, J., Tans-Kersten, J. e Allen, C. Behavior of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 during latent and active infection of geranium. *Phytopathology*, v.95, n.2, Feb, p.136-143. 2005..

Tabieres, M. S., Andreu, R. C. e Lima, M. V. Efeitos da biotecnologia nas economias agrícolas dos países menos desenvolvidos. 2003.Disponível em: <http://www.comciencia.br/reportagens/agronegocio/16.shtml>. Acessado em: 14/08/2009.

Takatsu, A. e Lopes, C. A. Murcha bacteriana em hortaliças: avanços científicos e perspectivas de controle. In: (Ed.). *Horticultura Brasileira*. Brasília: , v.15, 1997. p.170 – 177

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. e Kumar, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, v.24, p.1596-1599. 2007.

Tans-Kersten, J., Brown, D. e Allen, C. Swimming motility, a virulence trait of *Ralstonia solanacearum*, is regulated by FlhDC and the plant host environment. *Molecular Plant Microbe Interaction*, v.17, n.6, Jun, p.686-695. 2004.

Wicker, E., Grassart, L., Coranson-Beaudu, R., Mian, D., Guilbaud, C., Fegan, M. e Prior, P. *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential. *Applied Environmental Microbiology*, v.73, n.21, Nov, p.6790-6801. 2007.

Yabuuchi, E. K., Y., Yano, I., Hotta, H. e Nishiuchi, Y. Transfer of two *Burkholderia* and as *Alcaligenes* species to *Ralstonia* Gen. Nov.: Proposal of *Ralstonia pickettii*, *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia eutropha*. *Microbiological Immunology*, v.39, p.8. 1995.

Yu, Q., Alvarez, A. M., Moore, P. H., Zee, F., Kim, M. S., De Silva, A., Hepperly, P. R. e Ming, R. Molecular Diversity of *Ralstonia solanacearum* Isolated from Ginger in Hawaii. *Phytopathology*, v.93, n.9, Sep, p.1124-1130. 2003.

9. APÊNDICES

APÊNDICES

Apêndice 1 – Reagentes, soluções e meios de cultura

Meio Kelman

5 mL de glicerol

1 g de caseína

10 g de peptona bacteriológica

18 g de ágar

Completar com 1000 mL de água destilada, ajustar o pH para 7,0 e autoclavar.

Para crescimento em meio líquido, não adicionar o Agar.

Meio Hayward

1g de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$

0,2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0,2 g de KCl

1g de Peptona

0,08 de Azul de Bromotimol

3g de Agar

Completar com 1000 ml de água destilada, ajustar o pH para 7,0 com NaOH

O meio deve ficar verde oliva

Solução de agarose para gel 1%

30 mL de TBE 1X

0,3 g de agarose

4 μL de brometo de etídio

Extração do DNA genômico

A. Lise das amostras de células

1. Diluir 1 ml de 50 mg / μL de proteinase K para 300 μL da solução de Lise Celular (Tissue and Cell Lysis Solution) para cada amostra.
2. Separar as células por centrifugação (0,1-0,5 ml de uma cultura *overnight* de Rs) e desprezar o sobrenadante, deixando cerca de 25 mL de líquido.
3. Ressuspender o sedimento celular no vortes por 10 segundos.
4. Adicionar 300 μL da solução de Lise Celular (Tissue and Cell Lysis Solution) contendo a proteinase K e homogeneizar.
5. Incubar a 65°C por 15 minutos e misturar no vortex a cada 5 minutos.
6. Resfriar as amostras a 37°C e adicionar 1 ml de 5 mg/ μL de RNase para cada amostra, homogeneizar.
7. Incubar a 37°C por 30 minutos.
8. Colocar as amostras em gelo por 3-5 minutos e então proceder com a precipitação do DNA na parte B.

B. Precipitação do DNA

1. Adicionar 175 μl de MPC (Protein Precipitation Reagent) para 300 μL de amostra e agitar vigorosamente durante 10 segundos (Vortex).
2. Centrifugar durante 10 minutos a ≥ 10.000 xg numa microcentrifuga.
3. Transferir o sobrenadante para um tubo de microcentrifuga limpo e eliminar o *pellet*.
4. Adicionar 500 μL de isopropanol para o sobrenadante recuperado. Inverter o tubo diversas vezes (30-40).
5. Centrifugar a 4°C por 10 minutos numa microcentrifuga.
6. Cuidadosamente jogar fora o isopropanol sem despejar o *pellet* de DNA.
7. Lavar duas vezes com etanol a 70%, tomando cuidado para não remover o *pellet*. Remova todo o etanol residual com uma pipeta.
8. Ressuspender o DNA em 35 μl de tampão TE.

Apêndice 2 – Sequência do gene da endoglucanase e sua tradução

> *Ralstonia solanacearum* GMI1000 endoglucanase sequence

```

1   ATG CTT GCC GGT TGC GGC GGC GGC GAC GGT GAC ACC ACC CTC AGC 45
1   M  L  A  G  C  G  G  G  G  D  G  D  T  T  L  S  15

46  ACG GCG GCC GCT ACC GAC ACC ACG ACC CTG AAG ACG GCC GCC ACC 90
16  T  A  A  A  T  D  T  T  T  L  K  T  A  A  T  30

91  ACC TCG ATC TCG CCG TTG TGG CTC ACC ATC GCC AAG GAC AGC GCG 135
31  T  S  I  S  P  L  W  L  T  I  A  K  D  S  A  45

136 GCG TTC ACG GTG AGC GGC ACG CGC ACG GTG CGC TAT GGC GCC GGC 180
46  A  F  T  V  S  G  T  R  T  V  R  Y  G  A  G  60

181 AGC GCG TGG GTG GCG AAG AGC ATG TCC GGC ACA GGC CAG TGC ACC 225
61  S  A  W  V  A  K  S  M  S  G  T  G  Q  C  T  75

226 GCC GCC TTC TTC GGC AAG GAT CCG GCG GCC GGT GTC GCC AAG GTA 270
76  A  A  F  F  G  K  D  P  A  A  G  V  A  K  V  90

271 TGC CAG GTG GCG CAG GGC ACG GGC ACC TTG CTG TGG CGC GGC GTC 315
91  C  Q  V  A  Q  G  T  G  T  L  L  W  R  G  V  105

316 AGC CTG GCC GGC GCC GAG TTC GGG GAG GGC AGC CTG CCG GGC ACC 360
106 S  L  A  G  A  E  F  G  E  G  S  L  P  G  T  120

361 TAC GGG AGC AAC TAC ATC TAT CCG TCC GCC GAC AGC GCG ACC TAC 405
121 Y  G  S  N  Y  I  Y  P  S  A  D  S  A  T  Y  135

406 TAC AAG AAC AAG GGC ATG AAC CTC GTG CGC CTG CCG TTC CGC TGG 450
136 Y  K  N  K  G  M  N  L  V  R  L  P  F  R  W  150

451 GAG CGG CTG CAG CCC ACG CTC AAC CAG GCG CTC GAC GCG AAC GAG 495
151 E  R  L  Q  P  T  L  N  Q  A  L  D  A  N  E  165

496 CTG TCG CGC CTG ACC GGG TTC GTC AAC GCC GTG ACG GCG GCC GGC 540
166 L  S  R  L  T  G  F  V  N  A  V  T  A  A  G  180

541 CAG ACG GTG CTG CTC GAT CCG CAC AAC TAC GCG CGC TAC TAC GGC 585
181 Q  T  V  L  L  D  P  H  N  Y  A  R  Y  Y  G  195

586 AAC GTG ATC GGC TCG AGC GCG GTG CCC AAC AGC GCG TAC GCC GAT 630
196 N  V  I  G  S  S  A  V  P  N  S  A  Y  A  D  210

631 TTC TGG CGG CGC GTG GCC ACC CAG TTC AAG GGC AAT GCC CGC GTC 675
211 F  W  R  R  V  A  T  Q  F  K  G  N  A  R  V  225

676 ATC TTC GGG CTG ATG AAC GAG CCC AAT TCG ATG CCG ACC GAG CAG 720
226 I  F  G  L  M  N  E  P  N  S  M  P  T  E  Q  240

721 TGG CTG TCC GGC GCC AAC GCC GCG CTG GCC 750
241 W  L  S  G  A  N  A  A  L  A

```

*As setas em vermelho mostram a localização do anelamento dos primers.

#Rs81	---	---	---	---	---
#Rs82	---	---	---	---	---
#Rs83	---	---	---	---	---
#Rs84	---	---	---	---	---
#Rs87	---	---	---	---	---
#Rs89	---	---	---	---	---
#Rs90	---	---	---	---	---
#Rs91	---	---	---	---	---
#Rs92	---	---	---	---	---
#Rs95	---	---	---	---	---
#Rs96	---	---	---	---	---
#Rs98	---	---	---	---	---
#Rs113	---	---	---	---	---
#Rs115	---	---	---	---	---
#Rs121	---	---	---	---	---
#Rs131	---	---	---	---	---
#Rs134	---	---	---	---	---
#Rs139	---	---	---	---	---
#Rs145	---	---	---	---	---
#Rs157	---	---	---	---	---
#Rs161	---	---	---	---	---
#Rs201	---	---	---	---	---
#Rs202	---	---	---	---	---
#Rs203	---	---	---	---	---
#Rs204	---	---	---	---	---
#Rs205	---	---	---	---	---
#Rs231	---	---	---	---	---
#Rs242	---	---	---	---	---
#Rs243	---	---	---	---	---
#Rs244	---	---	---	---	---
#Rs245	---	---	---	---	---
#Rs246	---	---	---	---	---
#Rs252	---	---	---	---	---
#Rs253	---	---	---	---	---
#Rs254	---	---	---	---	---
#Rs260	---	---	---	---	---
#Rs261	---	---	---	---	---
#Rs141	---	---	---	---	---
#Rs156	---	---	---	---	---
#Rs241	---	---	---	---	---
#Rs94	---	---	---	---	---
#Rs99	---	---	---	---	---
#Rs213	---	---	---	---	---
#Rs240	---	---	---	---	---

Apêndice 4 – Artigo

Title: Diversity of Brazilian biovar 2 strains of *Ralstonia solanacearum*

**Bárbara G. Santana¹, Carlos A. Lopes², Elba Alvarez³, Cristine C. Barreto¹, Caitilyn Allen⁴
and Betania F. Quirino^{1,5}**

¹Universidade Católica de Brasília, Genomic Sciences and Biotechnology Program, Brasília, DF, Brazil, 70790-160

² Embrapa-Hortaliças, Brasília, DF, Brazil, 70359-970

³Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, Apdo 10, San José de las Lajas, La Habana, Cuba

⁴University of Wisconsin-Madison, Department of Plant Pathology, WI, USA, 53706

⁵Embrapa-Agroenergy, Brasília, DF, Brazil, 70770-901

Running headline: Brazilian *Ralstonia* diversity

Corresponding author's address:

Dr. Betania F. Quirino
Universidade Católica de Brasília
Program in Genomic Sciences and Biotechnology
SGAN Quadra 916, Módulo B, Av. W5 Norte
70.790-160 Brasília, DF, Brazil
Phone: +55+61+3448-7115
FAX: +55+61+3347-4797
E-mail: betaniaf@pos.ucb.br

Abstract

Aims: To use traditional and molecular methods to analyze 59 Brazilian strains of *R. solanacearum*.

Methods and Results: PCR with specific primers confirmed all 59 bacterial strains as belonging to the *R. solanacearum* species complex and all were classified as biovar 2 based on the acidification of sugars and alcohols. Multiplex phylotype PCR assigned all strains to phylotype II. Analysis of the endoglucanase gene sequence showed that most strains belong to sequevar 1. BOX-PCR fingerprint data indicate that the Brazilian strains can be grouped by region and date of isolation.

Conclusions: Phylogenetic analysis based on *egl* sequence was more discriminating than BOX-PCR.

Significance and Impact of Study: *R. solanacearum*, responsible for bacterial wilt disease, has traditionally been classified into biovars and races that have little phylogenetic meaning. Because of its genetic heterogeneity, the diagnosis of relevant subgroups for predicting host susceptibility and pathogenicity is challenging. This is the first study to address the diversity of a collection of Brazilian *R. solanacearum* strains using the phylotype and sequevar classification scheme. A specific and accurate detection of the pathogen is essential for protection of susceptible crops as well as breeding of resistant varieties.

Keywords: bacterial wilt, *Solanum tuberosum*, endoglucanase gene, diversity, phylotype

Introduction

Ralstonia solanacearum causes bacterial wilt, a serious disease and a major constraint to the production of many economically important crops such as tomato (*Solanum lycopersicon* L.), potato (*Solanum tuberosum* L.), tobacco (*Nicotiana tabacum* L.), pepper (*Capsicum annuum* L.) and eggplant (*Solanum melongena* L.) in tropical, subtropical, and warm temperate regions of the world (Hayward 1994a). This pathogen is found on six continents and has an unusually extensive range of hosts, including hundreds of species in more than 50 botanical families, making bacterial wilt one of the most important bacterial diseases of plants (Hayward 1991). As a soil borne pathogen, *R. solanacearum* naturally infects its hosts through the roots (Liu et al. 2005). It rapidly invades the xylem vessels and spreads to the above ground parts through the vascular system causing wilt symptoms and eventually death of the plant (Tans-Kersten et al. 2004).

Controlling bacterial wilt is very difficult because *R. solanacearum* can survive in alternative hosts or as a saprophytic organism for long periods in different soil types (Denny 2005). The pathogen uses a variety of organic compounds as a source of energy, such as sugars and fatty acids, and may also use aromatic compounds derived from degradation of lignin. Because of this, the soil remains a favorable environment for this pathogen even after the death of the host (Genin and Boucher 2002).

As a highly diversified pathogen, *R. solanacearum* is considered a species complex, a heterogeneous group of related strains (Gillings and Fahy 1994). Classification of *R. solanacearum* into meaningful subgroups that share characteristics such as pathogenicity, host range and geographical origin is important as it can be used to predict the behavior of newly identified strains (Fegan and Prior 2005; Prior and Fegan 2005). Historically, the species complex was divided into five races based loosely on host range: Race 1 strains infect the family Solanaceae and many other hosts, race 2 strains infect primarily banana and plantain, race 3 strains infect potato, tomato, and several other hosts, usually in more temperate conditions, race 4 strains infect ginger, and race 5

strains infect mulberry (Buddenhagen et al. 1962; Denny 2006). On the other hand, the commonly used classification into biovars is based on ability to produce acid from a panel of carbohydrates (Hayward 1991). The only association between races and biovars is that race 3 corresponds to biovar 2 (Hayward, 1991). These methods, however, are of limited utility because host ranges overlap, especially following artificial inoculation and neither race nor biovar corresponds to geographic origin or to phylogenetic relationships suggested by DNA sequence data from diverse strains.

Recently, Fegan and Prior (2005) proposed a new hierarchical classification scheme based on sequence analysis of the internal transcribed spacer region and the endoglucanase (*egl*) gene that defines phlotypes and sequevars (sequence variants), respectively. Four phlotypes were proposed: phlotype I corresponds to the “Asian” division 1 of Cook et al. (1989), phlotype II corresponds to the “American” division 2 of Cook and Sequeira (1991), phlotype III contains strains from Africa and the Indian Ocean and phlotype IV contains strains from Indonesia, which may be the center of diversity for *R. solanacearum* (Cook and Sequeira 1991). Phlotypes themselves can be subgrouped into sequevars, clusters of strains based on differences in the sequence of a portion of the endoglucanase (*egl*) gene, a highly conserved DNA sequence (Fegan and Prior 2005; Prior and Fegan 2005). The endoglucanase enzyme also plays an important role in the pathogenicity of *R. solanacearum*. *Egl*-deficient mutants are slower to cause disease symptoms than the wild type strain (Roberts et al. 1988; Denny et al. 1990), suggesting that this gene is likely to be conserved. Further, the *egl* sequence was moderately variable so the gene was used for the phylogenetic characterization of this group.

There are a few, but increasing studies about *R. solanacearum* strains from various parts of the world using the classification proposed by Fegan and Prior (Fegan and Prior 2005; Prior and Fegan 2005). A recent study in the Americas analyzed the diversity of *Ralstonia* strains in Guatemala (Perez et al. 2008). Three distinct phlotypes were identified among the 50 strains

studied isolated from different hosts. All the potato strains were classified as phylotype II sequevar 1.

A Florida study (Ji et al. 2007) showed that the number of cases of wilting in geranium, hydrangea, and pepper in 2003 and 2004 were caused by *R. solanacearum* biovars 1 and 3, and not by the biovar 2 group, which is the group typically pathogenic to potato. This approach was also used to characterize strains of *R. solanacearum* from Martinique in the French West Indies. The study proposed that Martinique strains belonging to phylotype II sequevar 4 but non-pathogenic to banana should be considered a new pathogenic variant within phylogenetic group II / 4 (Wicker et al. 2007).

Horita and Tsuchiya (2001) grouped diverse biovar 2 strains from Brazil and Japan into two distinct subgroups with low average similarity among strains. According to these authors, biovar 2 strains found in tropical Asia have a broad host range, and are not equivalent to race 3 biovar 2 (sequevar 1) found associated with potato crops in tropical highlands. Corroborating this study, Jeong et al. (2007) showed that Korean and Japanese strains belonging to biovars 1, 2, 3, and 4 exhibited only weak genetic relationships to the American, African, and European strains, indicating that the genetic backgrounds of the Korean and Japanese strains are distinct from those of the non-Asian strains. A third study with Asian strains by Villa et al. (2005) showed high diversity of Asian strains and grouping of strains from America, Africa and Europe in a separate cluster.

Hitherto, there are no detailed reports classifying Brazilian strains into phylotypes and sequevars. In this study we used the phylotype/sequevar classification scheme as well as BOX-PCR to examine the genetic diversity and the phylogenetic position of a collection of 59 Brazilian strains of *R. solanacearum* belonging to biovar 2 race 3, isolated mainly from potatoes.

Materials and Methods

Bacterial strains

Strains used in this study are part of an *R. solanacearum* collection maintained by Embrapa – Hortaliças (Brasilia, Brazil) and are listed in Table 1. Most of the strains (49) were isolated from potato, one strain was isolated from pepper, eight strains were isolated from eggplant, and one was isolated from tomato. Strains were collected over a period of approximately 20 years from the most important potato producing regions of Brazil (Figure 1), both in humid and dry areas of the country (Table 1).

Ralstonia solanacearum was cultured on modified Kelman's triphenyl tetrazolium chloride (TZC) medium (Kelman 1954) (glycerol 5 mL/L, caseine 1g/L, bacto peptone 10g/L and agar 18g/L, pH 7.0). Strains were recovered from the original collection by streaking single colonies on modified Kelman's medium and incubated at 28°C for 48h. One loopful of bacterial culture was then transferred to a cryotube with 2 mL of double-distilled sterile water, and the cultures were stored at room temperature for the duration of the experiments.

Biovar characterization

Strains were classified into biovars using a variation of the physiological tests developed by Hayward (1964) which assay the ability of strains to acidify a panel of sugars and alcohols. All tests included control strains for biovar 1 (K60), biovar 2 (UW551), biovar 3 (GMI1000), biovar 4 (UW151), and biovar 5 (UW373) (Ji et al. 2007).

PCR analysis

For DNA extraction, *R. solanacearum* strains were inoculated on modified Kelman's medium and grown overnight at 28°C and 200 rpm. DNA was extracted from approximately 1 mL

of cells using the Masterpure DNA purification kit (Epicentre Biotechnology) following the manufacturer's instructions.

Four PCR procedures were used to characterize the Brazilian *R. solanacearum* strains as previously described (Prior and Fegan 2005). To confirm that all isolated bacterial strains were in fact *R. solanacearum*, species-specific primers 759/760 were used (Table 2) (Opina et al. 1997). To classify *R. solanacearum* strains into phlotypes, a PCR reaction that included a set of four phlotype-specific forward primers (Table 2) (Nmult:21:1F, Nmult:21:2F, Nmult:22:InF, and Nmult:23:AF), and a single conserved reverse primer (Nmult:22:RR) targeted to the 16S-23S intergenic spacer region (ITS) was performed. The PCR reaction contained 1X *Pfu* polymerase buffer, 0.25 mM each dNTP, 10 pmol of each primer, 300 ng of template DNA, and 2.5 U of *Pfu* Ultra High Fidelity Polymerase (Invitrogen, LifeTechnologies) in a final volume of 50 μ L. The ITS was amplified using the protocol described by Fegan and Prior (2005). PCRs were performed in the Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems). PCR products were separated on 2% agarose gels and visualized by staining with ethidium bromide.

PCR amplification of a 750-bp region of the *egl* gene was performed using the primer pair Endo-F and Endo-R (Table 2). The reaction mixture, in a total volume of 50 μ L, contained PCR buffer (supplied by the manufacturer), 1.5 mM MgCl₂, 0.25 mM of each dNTP, 10 pmol of each primer, ~100 ng of *R. solanacearum* genomic DNA as template, and 1U of High Fidelity Platinum *Taq* polymerase (Invitrogen, LifeTechnologies). PCR was performed using a GeneAmp PCR system 9700 thermocycler (Applied Biosystems) with the following protocol: a denaturation step of 96°C for 3 min, 30 cycles of 95°C for 30 s, 69°C for 45 s, and 72°C for 2 min, and a final extension step of 72°C for 10 min. Amplification products were separated on a 2% agarose gel, and visualized by ethidium bromide staining. Fresh PCR products were used directly for sequencing. Sequencing of both DNA strands, with the primers ENDO-F and ENDO-R (Table 1), was performed on the Prism 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions.

BOX-PCR was performed using a primer (Table 2) that binds to random places in the template DNA generating PCR products characteristic for each strain. The PCR reaction mixture of 25 μ L contained 1 X buffer (supplied by the manufacturer), 1.5 mM MgCl₂, 0.25 mM of each dNTP, 10 pmol of the BOX-PCR primer, 50 ng *R. solanacearum* genomic DNA as template and 1U of *Taq* polymerase (Invitrogen, LifeTechnologies). The PCR was performed using a thermocycler GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) with the following protocol: an initial denaturation step of 95° C for 7 min, 30 cycles of 94° C for 1 min, 53° C for 1 min and 65° C for 8 min and a final extension step of 65° C for 15 min. The amplified products were analyzed by electrophoresis on 1.5% agarose gels and bands were visualized by ethidium bromide staining. BOX-PCR of each *R. solanacearum* strain was performed three times.

Phylogenetic analysis and BOX-PCR dendrograms

Sequences of the *egl* fragment were analyzed using the software MEGA 4.0 (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) (Tamura et al. 2007). The 750 bp sequences of the *egl* gene was aligned using ClustalW (Larkin et al. 2007) and manually adjusted. Sequence data were analyzed using the three major phylogenetic approaches offered by the MEGA software. Evolutionary relationships between sequences were determined using the algorithm of Jukes and Cantor (1969). Phylogenetic trees were constructed from the genetic distance data using the neighbor-joining (NJ) method (Saitou and Nei 1987) with 5,000 bootstrap resamplings of the data to test tree topologies.

Images of BOX-PCR gels were analyzed using the Bionumerics 5.1 software (Applied Maths, Belgium) using default parameters. BOX-PCR of each strain was independently repeated three times. Dendrograms were constructed using the Neighbor Joining method.

Accession numbers

All *egl* sequences from the Brazilian strains of *R. solanacearum* described in this study were deposited in Genbank and assigned numbers GU049781 to GU049839.

Results

PCR with specific primers and biovar classification

All 59 Brazilian strains produced a band of the expected size (results not shown) with the specific primers 759 and 760 (Opina et al. 1997), corroborating that they in fact belong to the *Ralstonia solanacearum* species complex.

The 59 Brazilian strains were classified into biovars according to their ability to produce acid from sorbitol, mannitol, dulcitol, lactose, maltose and celobiose. Most of the strains studied were isolated from symptomatic potato, however, a few were from eggplant or bellpepper. After three weeks of incubation, the medium on the plates showed a green color for the alcohols (sorbitol, mannitol, and dulcitol) indicating that the medium pH had not changed, but the medium containing the carbohydrates (lactose, maltose and celobiose) had turned yellow, indicating oxidization (results not shown). According to Hayward (1994b) these results demonstrate that all Brazilian strains tested belong to biovar 2.

Multiplex PCR for phylotyping

For all the Brazilian strains tested, an amplified fragment of 372-bp was obtained, indicating that they belonged to phylotype II (Table 2), the group that originated in the Americas (Fegan and Prior 2005; Prior and Fegan 2005).

Endoglucanase gene sequence analysis

Partial gene sequences of endoglucanase were generated from the set of Brazilian strains, all belonging to biovar 2. As shown by Wicker et al. (2007), trees constructed with other phylogenetic methods such as maximum likelihood, maximum parsimony and Bayesian analysis are fully consistent with the Neighbor Joining method (NJ), therefore, only the NJ phylogenetic tree,

with bootstrap values, is presented (Figure 2). The *egl* sequence phylogenetic tree shows a branching pattern that clearly separates the four phylotypes, similarly to what has been obtained by Wicker et al. (2007). Reference strains for phylotypes I (R292, UW151, GMI1000 and JT523), III (CFBP3059 and NCPPB332) and IV (MAFF301558 and PSI7), clustered separately with high bootstrap values. The reference sequences for phylotype II, such as CIP309, JT516, MOLK2, UW129 and K60 clustered together with the Brazilian strains classified by multiplex PCR as phylotype II (Figure 2).

The group of Brazilian strains belonging to phylotype II was resolved into two branches, one containing the strains Rs 145, isolated from potato in Minas Gerais and Rs 201, isolated from bellpepper in Brasilia. These strains clustered with CFBP2958, a known sequevar 5 strain from tomato in the French West Indies (Figure 3). All other strains clustered closely together with the strains used as references for sequevar 1 and were also related to CIP309 of sequevar 2. Many of the strains analyzed, such as Rs 115 and Rs 23, had the same nucleotide sequence, showing no phylogenetic distance between them. Based on this result, this Brazilian group of *R. solanacearum* strains was assigned to phylotype II sequevar 1.

BOX-PCR analysis

BOX-PCR fingerprint patterns of the Brazilian *R. solanacearum* strains were used to calculate a similarity coefficient with the Bionumerics 5.0 software and then used to construct dendrograms. A representative result is shown in Figure 3. Reference strains for phylotypes I (UW151, UW363, GMI1000), III (UW386) and IV (UW443) (Ji et al. 2007) were grouped in the same branch of the dendrogram. Reference strain for phylotype II (K60) and all Brazilian *R. solanacearum* strains, which belong to phylotype II, formed another large branch. Within the phylotype II branch, a group of strains from Ibicoara (BA), a group of strains from Castro (PR) and a group from Brasilia (DF) were well separated by BOX-PCR analysis. Many of the Brazilian strains grouped not only according to the geographical location where the strains were collected but

also the date of collection (Figure 3). For example, the Brasilia (DF) strains collected in 1992 grouped together and separately from other Brasilia strains collected in 1987 and 1989. There was also a separation into groups by host. The strains from eggplant clustered separately from the potato isolates.

Discussion

Ralstonia solanacearum is a heterogenous group with large host range. Defining subgroups within the species complex of *R. solanacearum* is important because it may help predict host susceptibility and pathogenicity. A number of studies reveal some of this diversity for different host plants (Yu et al. 2003; Ji et al. 2007; Ivey et al. 2007; Jeong et al. 2007; Wicker et al. 2007; Norman et al. 2009). Brazil is a great producer of solanaceous crops, as well as other important crops that are hosts to *R. solanacearum*. Hitherto, no studies have used the newer molecular methods proposed by Fegan and Prior (Fegan and Prior 2005; Prior and Fegan 2005) to explore the diversity of Brazilian strains of this pathogen (Bringel et al. 2004; Netto et al. 2003; Costa et al. 2007; Silveira et al. 2005). Before this study there were only scant reports assigning a total of six Brazilian potato strains to phylotype II (Fegan and Prior 2005; Wicker et al. 2007; Guidot et al. 2009; Sanchez et al. 2008; Villa et al. 2005).

Diagnosis of relevant discriminating subgroups of *R. solanacearum* is challenging because of the heterogeneity of the complex and variable host ranges for some strains of this pathogen. A specific and accurate detection of the pathogen is essential for protection of susceptible crops. For example, strains from race 3, that is pathogenic to potato, must be strictly controlled in potato producing regions. It is estimated that *R. solanacearum* race 3 biovar 2 (R3B2) bacterial wilt of potato is responsible for losses of nearly a billion dollars a year in about 40 countries (Denny 2006, Elphinstone 2005). Therefore, characterization of strains responsible for outbreaks may direct policies for quarantine of imported materials and the actions taken to combat and prevent the spread

of the pathogen to other areas of the same country. Further, plant breeders need a good understanding of pathogen genetic diversity in order to successfully select crops resistant to strains of *R. solanacearum* present in Brazil.

In 2002, *R. solanacearum* R3B2 was listed in the United States as a bioterrorism Select Agent (Lambert 2002); R3B2 strains are also quarantine pathogens in Europe and Canada. Although R3B2 is best known as a pathogen of potato, these strains also can infect tomato and geranium plants, and this pathogen is very widespread in South and Central America (Swanson et al. 2005). In Brazil, *R. solanacearum* is found in most of the potato producing regions (Lopes 2005). Race 3 is prevalent, in the largest potato cultivation areas in the country, the south and southeast regions, although other *R. solanacearum* strains are also found there (Lopes 1994).

Recent studies have used molecular data to classify *R. solanacearum* that were isolated in a variety of host species from different parts of the world into subgroups (Jaunet and Wang 1999; Ji et al. 2007; Ivey et al. 2007; Jeong et al. 2007; Wicker et al. 2007). Our study revealed that all 59 Brazilian biovar 2 strains tested belong to phylotype II, corroborating previous findings (Fegan and Prior 2005; Prior and Fegan 2005) that suggest the prevalence and likely origin of this phylotype in the Americas.

In many molecular studies, the endoglucanase gene sequence has been used as a tool for determining phylogenetic relationships between *R. solanacearum* strains. At first, this gene would not be expected to be efficient for phylogenetic analysis since the strains belong to the same "species" and it is a coding gene that confers an important virulence trait. The variation expected for this kind of gene is small (Nei and Kumar 2000). However, the endoglucanase gene had enough sequence variability to separate Brazilian *R. solanacearum* strains efficiently. Some important features about this gene that allowed its use for this purpose are the fact that there is just one copy of the endoglucanase gene in the genome and the fact that it is a conserved gene; that is, it is present in all strains tested to date (Fegan and Prior 2005; Roberts et al. 1988). As shown in the phylogenetic tree (Figure 2) and in other studies (Ji et al. 2007; Jeong et al. 2007; Wicker et al.

2007; Norman et al. 2009), this variation seems to be related to the host of the pathogen, since strains from the same host species tend to be grouped in the same clusters. Alternatively, this result may reflect the fact that strains found on a given host are more likely to share a recent common ancestor.

The *egl* phylogenetic tree presented in this study (Figure 2) is in good agreement with previous work (Fegan and Prior 2005; Ji et al. 2007; Wicker et al. 2007). All sequences analyzed in this study grouped into existing phylotypes and sequevars as previously observed. This result gives further support to the robustness of the proposed classification schemes based on phylotypes and sequevars. Our phylogenetic evidence based on the *egl* gene sequence indicates that there is little diversity among Brazilian R3B2 strains (Buddenhagen et al. 1962; Hayward 1994b), which were mostly grouped with known sequevar 1 strains (Figure 2). This is similar to what was found in the study with *R. solanacearum* from Guatemala, where all potato strains were classified as sequevar 1 (Sanchez et al. 2008). Only one strain from potato, Rs 145, and one from bell pepper, Rs 201, grouped with sequevar 5. This was an interesting observation since other sequevar 5 strains belong to biovar 1 (Ji et al, 2007). This finding deserves further investigation with a larger number of strains. The other non-Brazilian strains used in this study as references for the other phylotypes and sequevars clustered in different groups from the Brazilian strains with high bootstrap values. In agreement with previously published results (Fegan and Prior 2005), in our tree sequevars 1 and 2 were found to be closely related.

Similar to the results obtained with the *egl* gene sequence, BOX-PCR fingerprint patterns allowed the separation of phylotypes. Furthermore, Figure 3 shows a clear separation in clusters by the location as well as the date of isolation. This may reflect adaptation of particular strains to a specific environment or the source of potato seed used for planting, since strain movement is expected to occur via potato seed. Our results are similar to those of Bringel et al. (2004) who used BOX-PCR to analyze 30 out of the 59 *R. solanacearum* strains used in this study. As reported by Bringel et al. (2004), we also observed clustering of the *R. solanacearum* eggplant strains, called

group III, as well as most of the strains they called group II (Rs 44, Rs 66, Rs 67, Rs 68, Rs 69, Rs 90, Rs 91, Rs 92 and Rs 113). Some minor differences in clustering may be due the larger number of strains used in this study as well as to the different similarity coefficients and algorithms used in this (Jaccard and Neighbor Joining) and in the Bringel et al. (2004) study (Sorensen and UPGMA). BOX-PCR was a rapid and useful method for separating not only phylotypes but also gave evidence for the existence of clonal lines. However, the BOX-PCR results did not separate the two strains, Rs 145 and Rs 201, that grouped with sequevar 5 in the *egl* phylogenetic analysis. In conclusion, the phylogenetic analysis based on *egl* sequence was more discriminating. Additionally, similar results were reported in a study by Silveira et al. (2005) where little genetic variability among biovar 2 strains isolated from potato plants in southern Brazil was observed with BOX-PCR and ERIC-PCR.

In this work, the phylotypes/sequevars classification system was applied to characterize a group of 59 Brazilian strains of *R. solanacearum*, mostly isolated from potato. Our study corroborates previous studies that show phylotype II to be associated with the Americas and revealed that most Brazilian potato strains of *R. solanacearum* are very similar. While this initial study showed that the geographically related strains were also phylogenetically related, we currently do not know if these strains also have similar hosts (i.e.; other than potato plants) and virulence. Only a few *R. solanacearum* strains that were not isolated from potato were included in this study and a larger study should be conducted to determine how these strains from other host plants group into sequevars. The collection of strains used in this study is representative of the Southern and Southeastern states of Brazil. Additional studies with strains from most of the Central-Western states are being pursued.

Acknowledgements

This work was supported by CNPq and UCB grants.

References

- Bringel, J.M., Bedendo, I., Guimarães, P.M. and Lopes, C.A. (2004) Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 isolates of potato and eggplant from Brazil by PCR. *Summa Phytopathol* **30**, 350-355.
- Buddenhagen, I.W., Sequeira, L. and Kelman, A. (1962) Designations of races in *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* **52**, 726.
- Cook, D., Barlow, E. and Sequeira, L. (1989) Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphisms with DNA probes that specify virulence and the hypersensitive response. *Mol Plant Microbe Interact* **2**, 113-121.
- Cook, D. and Sequeira, L. (1991) Strain differentiation of *Pseudomonas solanacearum* by molecular genetic methods. In *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum* ed. Hayward, A.C. and Hartman, G.L. pp.77-94. Wallingford, United Kingdom: CAB International.
- Costa, S.B., Ferreira, M.A.S.V. and Lopes, C.A. (2007) Diversidade patogênica e molecular de *Ralstonia solanacearum* da região amazônica brasileira. *Fitopatol Bras* **32**, 285-294.
- Denny, T.P. (2005) A short history of biochemical and genetic research on *Ralstonia solanacearum* pathogenesis. In *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum species complex* ed. Allen, C.P., Prior, P. and Hayward, A. C. pp.323 - 334. St, Paul, MN: APS press.
- Denny, T. P. (2006) Plant pathogenic *Ralstonia* species. In *Plant-Associated Bacteria*. ed. Gnanamanickam, S.S. pp. 573-644. Dordrecht, The Netherlands: Springer Publishing.
- Denny, T.P., Carney, B.F. and Schell, M.A. (1990) Inactivation of multiple virulence genes reduces the ability of *Pseudomonas solanacearum* to cause wilt symptoms. *Mol Plant Microbe Interact* **3**, 293-300.

Elphinstone, J. G. (2005) The current bacterial wilt situation: a global overview. In *Bacterial wilt: The disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex*. ed. Allen, C., Prior, P. and Hayward, A.C. pp. 9-28. St. Paul, MN: American Phytopathological Society.

Fegan, M. and Prior, P. (2005) How complex is the "*Ralstonia solanacearum* species complex?". In *Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex* ed. Allen, C., Prior, P. and Hayward, A.C. pp.449-461. St. Paul, MN: APS press.

Genin, S. and Boucher, C. (2002) Pathogen Profile: *Ralstonia solanacearum*. *Mol Plant Pathol* **33**, 111-118.

Gillings, M.R. and Fahy, P. (1994) Genomic fingerprinting: towards a unified view of the *Pseudomonas solanacearum* species complex. In *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum** ed. Hayward, A.C.H., G.L. pp.95-112: Wallingford: CAB International.

Guidot, A., Elbaz, M., Carrere, S., Siri, M.I., Pianzola, M.J., Prior, P. and Boucher, C. (2009) Specific genes from the potato brown rot strains of *Ralstonia solanacearum* and their potential use for strain detection. *Phytopathology* **99**, 1105-1112.

Hayward, A.C. (1964) Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *J Appl Bacteriol* **27**, 265-277.

Hayward, A.C. (1991) Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu Rev Phytopathol* **29**, 65-87.

Hayward, A.C. (1994a) The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. In *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum** ed. Hayward, A. C.; Hartman, G. L. pp. 9-24. Wallingford: CAB International.

Hayward, A.C. (1994b) Systematics and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. In *Bacterial wilt: The disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum* eds. Hayward, A.C. and Hartman, G.L. pp.123-135. Wallingford: CAB International.

Horita, M. and Tsuchiya, K. (2001) Genetic diversity of Japanese strains of *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology* **91**, 399-407.

Ivey, M.L., Gardener, B.B., Opina, N. and Miller, S.A. (2007) Diversity of *Ralstonia solanacearum* infecting eggplant in the Philippines. *Phytopathology* **97**, 1467-1475.

Jaunet, T.X. and Wang, J.-F. (1999) Variation in genotype and aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* Race 1 isolated from tomato in Taiwan. *Phytopathology* **89**, 320-327.

Jeong, Y., Kim, J., Kang, Y., Lee, S. and Hwang, I. (2007) Genetic diversity and distribution of Korean isolates of *Ralstonia solanacearum*. *Plant Dis* **91**, 1277 - 1287.

Ji, P., Allen, C., Yao, J., Elphinstone, J.G., Jones, J.B. and Momol, M.T. (2007) New diversity of *Ralstonia solanacearum* strains associated with vegetable and ornamental crops in Florida. *Plant Dis* **91**, 195 - 203.

Jukes, T.H. and Cantor, C.R. (1969) Evolution of protein molecules. In *Mammalian protein metabolism* ed. Munro, H.N. pp.21-132. New York, NY: Academic Press.

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

Lambert, C.D. (2002) Agricultural Bioterrorism Protection Act of 2002: Possession, use and transfer of biological agents and toxins; Interim and Final Rule ed. Register, F. pp.76908-76938.

Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J. and Higgins, D.G. (2007) ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics* **23**, 2947-2948.

Liu, H., Zhang, S., Schell, M.A. and Denny, T.P. (2005) Pyramiding unmarked deletions in *Ralstonia solanacearum* shows that secreted proteins in addition to plant cell-wall-degrading enzymes contribute to virulence. *Mol Plant Microbe Interact* **18**, 1296-1305.

Lopes, C.A. (1994) Ecologia de *Pseudomonas solanacearum*. In *Taller sobre enfermidades bacterianas de la papa 1* pp.17-22. Brasília: Memórias... Brasília: Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças/ EMBRAPA.

Lopes, C.A. (2005) *Murchadeira da Batata*. Itapetininga-SP: Associação Brasileira da Batata.

Nei, M. and Kumar, S. (2000) *Molecular evolution and phylogenetics*. New York: Oxford University Press.

Netto, R.A.C., Pereira, B.G., Noda, H. and Boher, B. (2003) Caracterização de isolados de *Ralstonia solanacearum* obtidos de tomateiros em várzea e em terra firme, no Estado do Amazonas. *Fitopatol Bras* **28**, 362-366.

Norman, D.J., Zapata, M., Gabriel, D.W., Duan, Y.P., Yuen, J.M., Mangravita-Novo, A. and Donahoo, R.S. (2009) Genetic diversity and host range variation of *Ralstonia solanacearum* strains entering North America. *Phytopathology* **99**, 1070-1077.

Opina, N., Tavner, F., Hollway, G., Wang, J.F., Li, T.H., Maghirang, R., Fegan, M., Hayward, A.C., Krishnapillai, V., Hong, W.F., Holloway, B.W. and Timmis, J. (1997) A novel method for development of species and strain specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). *Asia-Pacific J Mol Biol Biotechnol* **5**, 19-30.

Perez, A.S., Mejia, L., Fegan and Allen, C. (2008) Diversity and distribution of *Ralstonia solanacearum* strains in Guatemala and rare occurrence of tomato fruit infection. *Plant Pathol* **57**, 320-331.

- Prior, P. and Fegan, M. (2005) Recent Developments in the phylogeny and classification of *Ralstonia solanacearum*. *Acta Hort* **695**, 127-136.
- Roberts, D.P., Denny, T.P. and Schell, M.A. (1988) Cloning of the *egl* gene of *Pseudomonas solanacearum* and analysis of its role in phytopathogenicity. *J Bacteriol* **170**, 1445–1451.
- Saitou, N. and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406-425.
- Silveira, J. R. P., Duarte, V., Moraes, M.G., Oliveira, A.M.R., Barni, V. and Maciel, J.L.N. (2005) Caracterização de estirpes de *Ralstonia solanacearum* isoladas de plantas de batata com murcha bacteriana, por PCR-Rep e RAPD. *Fitopatol Bras* **30**, 615-622.
- Swanson, J.K., Yao, J., Tans-Kersten, J. and Allen, C. (2005) Behavior of *Ralstonia solanacearum* Race 3 Biovar 2 during latent and active infection of geranium. *Phytopathology* **95**, 136-143.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**, 1596-1599.
- Tans-Kersten, J., Brown, D. and Allen, C. (2004) Swimming motility, a virulence trait of *Ralstonia solanacearum*, is regulated by FlhDC and the plant host environment. *Mol Plant Microbe Interact* **17**, 686-695.
- Versalovic, J., de Bruijn, F.J. and Lupski, J.R.. (1998). Repetitive sequence based PCR (rep-PCR) DNA fingerprinting of bacterial genomes. In *Bacterial genomes: physical structure and analysis*. eds. de Bruijn, F. J., Lupski, J. R. and Weinstock G. M. pp. 437–454. New York: Chapman and Hall.
- Villa, J.E., · Tsuchiya, K., · Horita, M., Natural, M., · Opina, N., · Hyakumachi, M. (2005) Phylogenetic relationships of *Ralstonia solanacearum* species complex strains from Asia and other

continents based on *16S* rDNA, endoglucanase, and *hrpB* gene sequences *J Gen Plant Pathol* **71**, 39-46.

Wicker, E., Grassart, L., Coranson-Beaudu, R., Mian, D., Guilbaud, C., Fegan, M. and Prior, P. (2007) *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential. *Appl Environ Microbiol* **73**, 6790-6801.

Yu, Q., Alvarez, A.M., Moore, P.H., Zee, F., Kim, M.S., de Silva, A., Hepperly, P.R. and Ming, R. (2003) Molecular diversity of *Ralstonia solanacearum* isolated from ginger in Hawaii. *Phytopathology* **93**, 1124-1130.

*Tables***Table 1.** Primers used for strain characterization.

Primer	Sequence	Reference
Multiplex Phylotype		
Nmult: 21:1F	5' CGT TGA TGA GGC GCG CAA TTT 3'	(Fegan and Prior 2005)
Nmult: 21:2F	5' AAG TTA TGG ACG GTG GAA GTC 3'	(Fegan and Prior 2005)
Nmult: 23:AF	5' ATT ACS AGA GCA ATC GAA AGA TT 3'	(Fegan and Prior 2005)
Nmult: 22: inf	5' ATT GCC AAG ACG AGA GAA GTA 3'	(Fegan and Prior 2005)
Nmult: 22:RR	5' TCG CTT GAC CCT ATA ACG AGT A 3'	(Fegan and Prior 2005)
Specific		
759	5' GTC GCC GTC AAC TCA CTT TCC 3'	(Opina et al. 1997)
760	5' GTC GCC GTC AGC AAT GCG GAA TCG 3'	(Opina et al. 1997)
Endoglucanase		
Endo-F	5' ATG CAT GCC GCT GGT CGC CGC 3'	(Ji et al. 2007)
Endo-R	5' GCG TTG CCC GGC ACG AAC ACC 3'	(Ji et al. 2007)
Box PCR		
Box	5' CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G 3'	(Versalovic et al. 1998)

1 **Table 2.** *Ralstonia solanacearum* strains used in this study.

Strain	Origin	Yr of isolation	Host	Phylogroup	Sequevar	GenBank Accession n°
RS 02	Brasília (DF)	1987	Potato	II	1	GU049781
RS 12	Itapetininga (SP)	1987	Potato	II	1	GU049782
RS 23	Bahia	1988	Potato	II	1	GU049783
RS 26	Castro (PR)	1988	Potato	II	1	GU049784
RS 27	Castro (PR)	1988	Potato	II	1	GU049785
RS 28	Castro (PR)	1988	Potato	II	1	GU049786
RS 30	Umuarama (PR)	1988	Potato	II	1	GU049787
RS 44	Brasília (DF)	1989	Potato	II	1	GU049788
RS 59	Castro (PR)	1990	Potato	II	1	GU049789
RS 66	Ibicoara (BA)	1990	Potato	II	1	GU049790
RS 67	Ibicoara (BA)	1990	Potato	II	1	GU049791
RS 68	Ibicoara (BA)	1990	Potato	II	1	GU049792
RS 69	Ibicoara (BA)	1990	Potato	II	1	GU049793
RS 71	Brazlândia (DF)	1990	Eggplant	II	1	GU049794
RS 77	Brasília (DF)	1991	Eggplant	II	1	GU049795
RS 81	Brasília (DF)	1992	Eggplant	II	1	GU049796
RS 82	Brasília (DF)	1992	Eggplant	II	1	GU049797
RS 83	Brasília (DF)	1992	Eggplant	II	1	GU049798
RS 84	Brasília (DF)	1992	Eggplant	II	1	GU049799
RS 87	Brasília (DF)	1992	Eggplant	II	1	GU049800
RS 89	Brasília (DF)	1992	Eggplant	II	1	GU049801
RS 90	Brasília (DF)	1992	Potato	II	1	GU049802
RS 91	Brasília (DF)	1992	Potato	II	1	GU049803
RS 92	Brasília (DF)	1992	Potato	II	1	GU049804
RS 94	Pirai do Sul (PR)	1992	Potato	II	1	GU049836
RS 95	Pirai do Sul (PR)	1992	Potato	II	1	GU049805
RS 96	Pirai do Sul (PR)	1992	Potato	II	1	GU049806
RS 98	Pirai do Sul (PR)	1992	Potato	II	1	GU049807
RS 99	Pirai do Sul (PR)	1992	Potato	II	1	GU049837
RS 113	Mariental (PR)	1992	Potato	II	1	GU049808
RS 115	Lapa (PR)	1992	Potato	II	1	GU049809
RS 121	Vargem Bonita (MG)	1992	Tomato	II	1	GU049810
RS 131	Araucária (PR)	1995	Potato	II	1	GU049811
RS 134	Contenda (PR)	1995	Potato	II	1	GU049812
RS 139	Lapa (PR)	1995	Potato	II	1	GU049813
RS 141	Lapa (PR)	1995	Potato	II	1	GU049833
RS 145	Viçosa (MG)	1997	Potato	II	5	GU049814
RS 156	Cristalina (GO)	1997	Potato	II	1	GU049834
RS 157	Cristalina (GO)	1997	Potato	II	1	GU049815
RS 161	Morro redondo (RS)	1997	Potato	II	1	GU049816
RS 201	Brasília (DF)	2001	Pepper	II	5	GU049817
RS 202	Castro (PR)	2001	Potato	II	1	GU049818
RS 203	Castro (PR)	2001	Potato	II	1	GU049819
RS 204	Castro (PR)	2001	Potato	II	1	GU049820
RS 205	Cristalina (GO)	2001	Potato	II	1	GU049821
RS 213	Ibicoara (BA)	2002	Potato	II	1	GU049838
RS 231	Buritis (MG)	2003	Potato	II	1	GU049822
RS 240	Cristalina (GO)	2004	Potato	II	1	GU049839
RS 241	Tatui (SP)	2004	Potato	II	1	GU049835
RS 242	Tatui (SP)	2004	Potato	II	1	GU049823
RS 243	Saturno (SP)	2004	Potato	II	1	GU049824
RS 244	Saturno (SP)	2004	Potato	II	1	GU049825
RS 245	Ocidental (GO)	2004	Potato	II	1	GU049826
RS 246	Uberaba (MG)	2005	Potato	II	1	GU049827
RS 252	Contenda (PR)	2005	Potato	II	1	GU049828
RS 253	Contenda (PR)	2005	Potato	II	1	GU049829
RS 254	Contenda (PR)	2005	Potato	II	1	GU049830
RS 260	Bahia	2005	Potato	II	1	GU049831
RS 261	Bahia	2005	Potato	II	1	GU049832
Reference Strains*						
GMI1000	French Guyana		Tomato	I	12**	AF295251
CFBP2968	Guadeloupe		Eggplant	I	13 to 18	EF371806
JT523	Reunion Island		Potato	I	13 to 18	AF295252
CFBP765	Japan		Tobacco	I	13 to 18	EF371810
NCPPB3190	Malaysia		Tomato	I	13 to 18	AF295253
ACH92	Australia		Ginger	I	13 to 18	AF295254
R292	China		<i>Morus alba</i>	I	12	AF295255
ICMP7963	Kenya		Potato	II	7	AF295263
K60	United States		Tomato	II	7	AF295262
A3909	Hawaii		Heliconia	II/6	6	EF371812
CFBP2958	Guadeloupe		Tomato	II	5	AF295266
CIP 309	Colombia		Potato	II	2	EF647735
IPO1609	The Netherlands		Potato	II	1 and 2	EF371814
JT516	Reunion Island		Potato	II	1 and 2	AF29525
NCPPB3987	Brazil		Potato	II	ND	AF295261
UW477	Peru		Potato	II	ND	AF295260
MOLK2	Philippines		<i>Musa sp.</i>	II/3	3	EF371841
UW9	Costa Rica		Heliconia	II/3	3	AF295257
CFBP1409	Honduras		<i>Musa sp.</i>	II/3	3	EF371808
CFBP1183	Costa Rica		Heliconia	II/3	3	EF371805
UW70	Colombia		<i>Musa sp.</i> (plantain)	II/4SFR	4	EF371811
UW129	Peru		<i>Musa sp.</i> (plantain)	II/4A	4	AF295256
UW162	Peru		<i>Musa sp.</i> (plantain)	II/4A	4	DQ011553
ICMP6782	Brazil		<i>Musa sp.</i>	II/6	6	DQ011554
ICMP9600	Brazil		<i>Musa sp.</i>	II/6	6	EF371813
ANT307	Martinique		<i>A. andreanum</i>	II/4NPB	4	DQ011546
UW21	Honduras		<i>Musa sp.</i>	II/6	6	AF295270
CFBP3059	Burkina Faso		Eggplant	III	19 to 23	AF295274

CFBP734	Madagascar	Potato	III	19 to 23	AF295276
NCPPB332	Zimbabwe	Potato	III	19 to 23	AF295272
JT525	Reunion Island	Geranium	III	19 to 23	DQ011558
MAFF301558	Japan	Potato	IV	10	EF371804
PSI7	Indonesia	Tomato	IV	10	AF295266

*Information for reference strains was obtained from Prior and Fegan, 2005, except for GMI1000 that was obtained from Prior and Fegan, 2005.

1
2
3

1

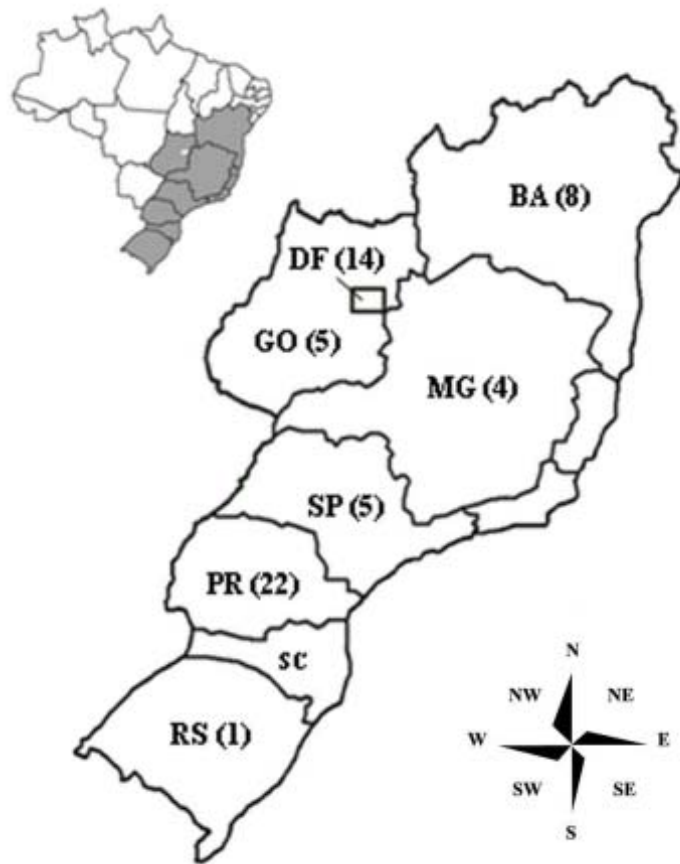
2 **Figure Legends**

3 **Figure 1.** Geographical distribution of *Ralstonia solanacearum* strains. On the left the map of
4 Brazil is shown. On the right, the States of Brazil where the strains used in this study were collected
5 are shown in greater detail. The number of strains collected in each state is displayed in parenthesis.

6 **Figure 2.** Phylogenetic NJ tree based on endoglucanase (*egl*) gene sequence from diverse Brazilian
7 *Ralstonia solanacearum* strains and the reference strains from each sequevar group. The number in
8 each node is the bootstrap value (5,000 resamplings). The rooted tree was constructed using the
9 software Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA). Names in bold correspond to
10 reference strains that have been previously studied. The bar represents 1 nucleotide substitution per
11 100 nucleotides.

12 **Figure 3.** Dendrogram using the Neighbor Joining (NJ) phylogenetic method based on BOX-PCR
13 fingerprints for 59 Brazilian strains and reference strains for the phlotypes of *Ralstonia*
14 *solanacearum*, using Bionumerics software. The bar indicates the similarity coefficient between the
15 strains.

16



1

2 Figure 1

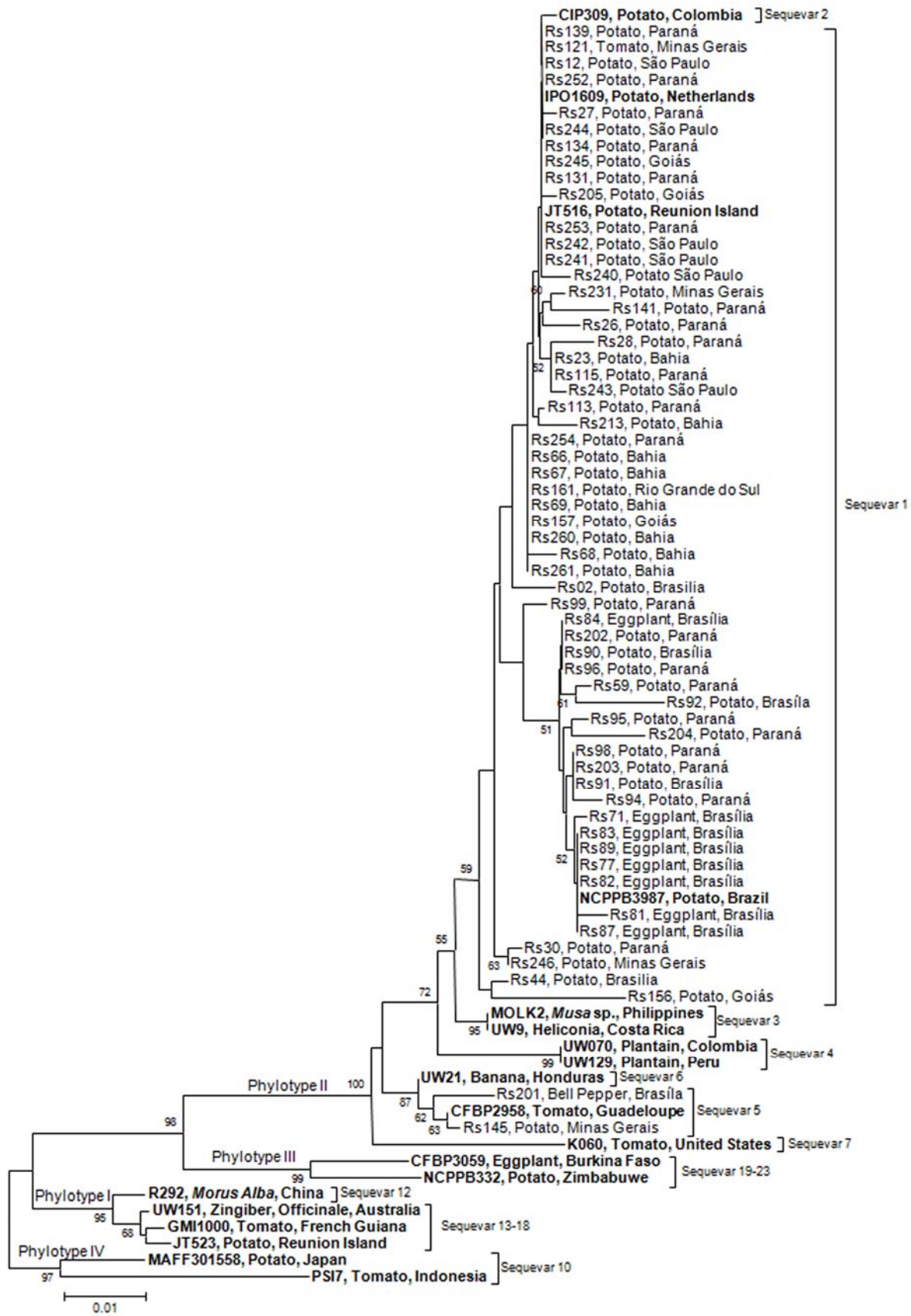


Figure 2

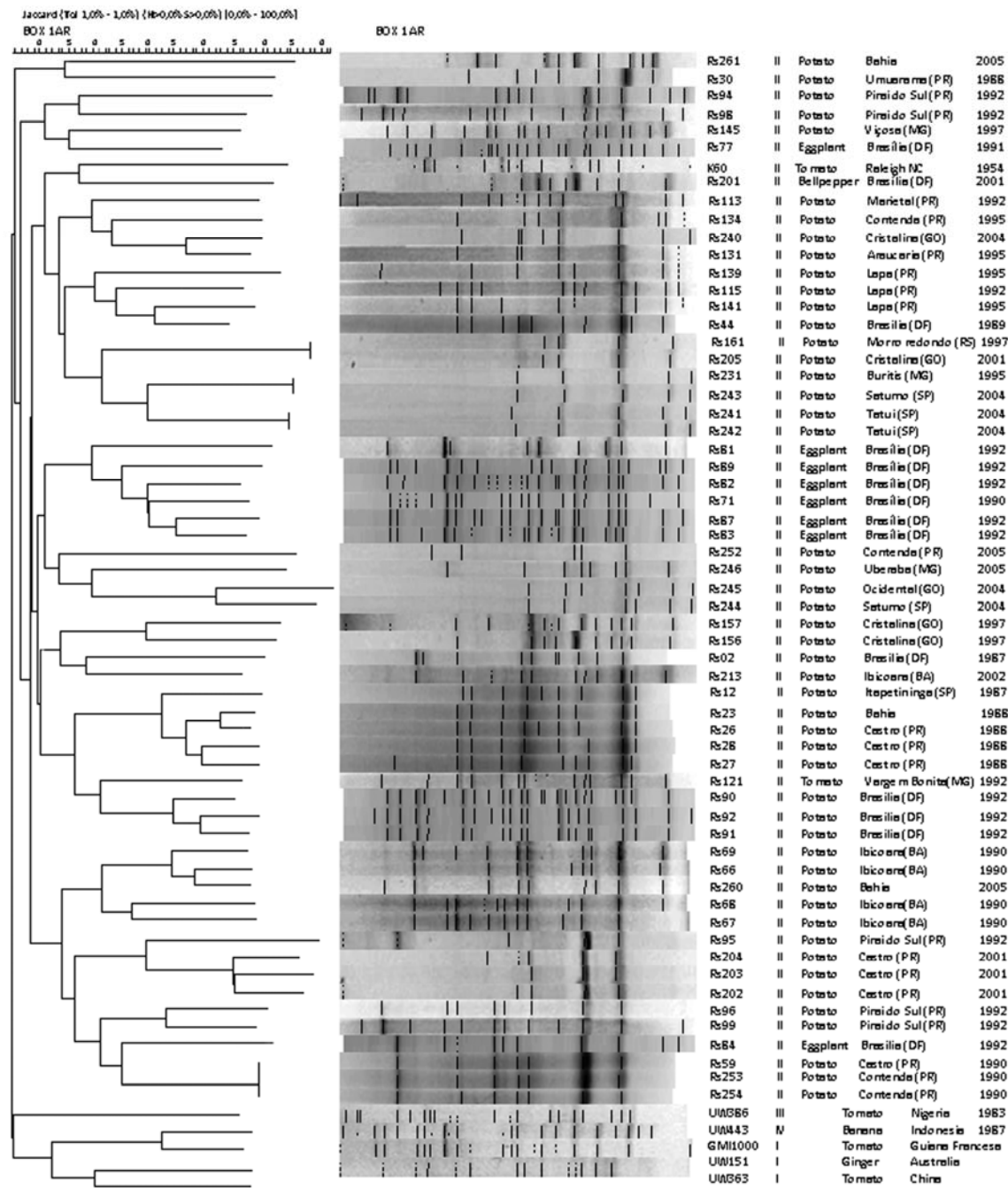


Figure 3

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)