



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

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. Seqüência 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.

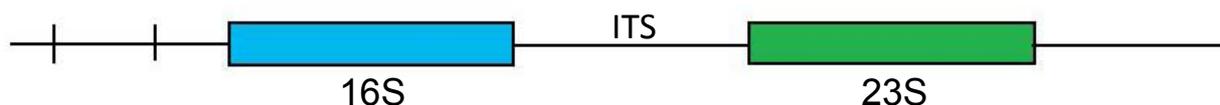


Figura 2: Esquema mostrando a localização da região ITS entre as sequências de RNA ribossomal.

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 filotipos 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).

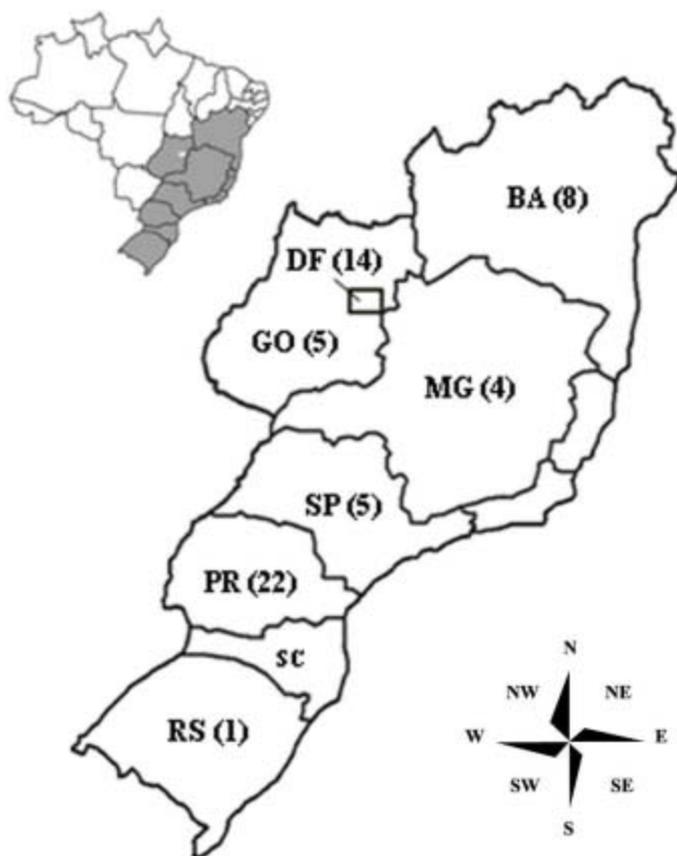


Figura 3: Distribuição geográfica dos isolados brasileiros, utilizados nesse trabalho, de *Ralstonia solanacearum*. À esquerda, o mapa do Brasil inteiro é mostrado. À direita, os estados do Brasil onde os isolados utilizados neste estudo foram coletados são apresentados em maior detalhe. O número de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

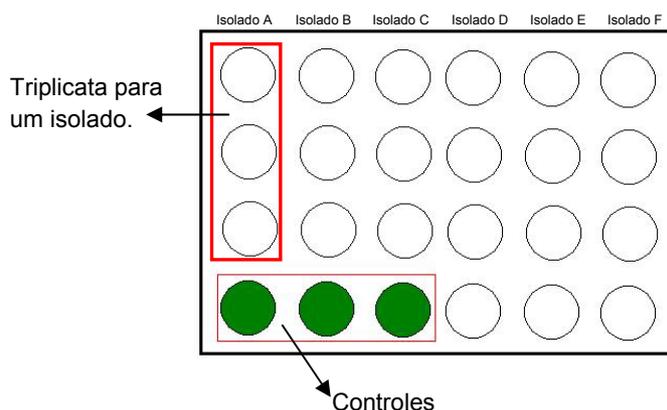


Figura 4: Esquema do experimento para determinação da biovar de *Ralstonia solanacearum* utilizando placas *Deep Well*. Cada placa foi utilizada para um substrato e cada isolado foi colocado em triplicata.

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.

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 enfermedades 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.